



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 758**

51 Int. Cl.:
C07K 14/755 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03746308 .0**
96 Fecha de presentación : **17.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1495052**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Factor VIII modificado.**

30 Prioridad: **18.04.2002 EP 02008712**
24.03.2003 EP 03006554

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2009

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Jones, Tim;**
Baker, Matthew y
Carr, Francis, J.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 319 758 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Factor VIII modificado.

5 **Ámbito de la invención**

La invención se refiere en particular a la modificación del factor VIII humano (FVIII) dando como resultado proteínas FVIII que sustancialmente son no-inmunogénicas o menos inmunogénicas que cualquier equivalente no modificado usada *in vivo*.

10

Antecedentes de la invención

En muchos casos la eficacia de una proteína terapéutica está limitada por una reacción inmune indeseada a la proteína terapéutica. Muchos anticuerpos monoclonales de ratón resultaban prometedores como terapia en numerosos escenarios de enfermedades humanas, pero en ciertos casos han fallado debido a la inducción de grado significativo de un anticuerpo antimurina humana (HAMA, por sus siglas en inglés human anti-murine antibody) [Schroff, R. W. *et al* (1985) *Cancer Res.* 45: 879-885; Shawler, D.L. *et al* (1985) *J. Immunol.* 135: 1530-1535]. Se han desarrollado numerosas técnicas para anticuerpos monoclonales con el fin de intentar reducir la respuesta HAMA [WO 89/09622; EP 0239400; EP 0438310; WO 91/06667]. Estos métodos de ADN recombinante generalmente han reducido la información genética del ratón en la construcción del anticuerpo final, incrementando la información genética humana en la construcción final. No obstante, los anticuerpos “humanizados” resultantes, en muchos casos aún provocaron una respuesta inmune en los pacientes [Issacs J.D. (1990) *Sem. Immunol.* 2: 449, 456; Rebello, P.R. *et al* (1999) *Transplantation* 68: 1417-1420].

25

Los anticuerpos no son la única clase de moléculas polipeptídicas que se administran como agente terapéutico contra el cuál se puede producir una respuesta inmune. Incluso proteínas de origen humano y con las mismas secuencias de aminoácidos que aparecen en los humanos pueden seguir induciendo una respuesta inmune en humanos. Ejemplos importantes incluyen el uso terapéutico del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos [Wadhwa, M. *et al* (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1353-1361] e interferón alfa 2 [Russo, D. *et al* (1996) *Bri. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. *et al* (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413]. En estas situaciones en las que estas proteínas humanas son inmunogénicas, se produce una supuesta rotura de la tolerancia inmunológica que de otro modo estaría operando en estos sujetos ante estas proteínas.

30

La situación es diferente cuando la proteína humana se administra como una terapia de sustitución, por ejemplo en una enfermedad genética donde hay una carencia constitucional de la proteína, como puede ser el caso de enfermedades como la hemofilia A, la enfermedad de Christmas, la enfermedad de Gaucher y otros numerosos ejemplos. En tales casos, la proteína de sustitución terapéutica puede funcionar inmunológicamente como una molécula extraña desde el principio y la eficacia de ésta se puede ver comprometida significativamente cuando los individuos son capaces de producir una respuesta inmune a la terapia.

40

Independientemente de si la proteína terapéutica es considerada una molécula extraña por el sistema inmune del huésped o si domina una tolerancia existente a la molécula, el mecanismo de reactividad inmune a la proteína es el mismo. La clave de la inducción de una respuesta inmune es la presencia en la proteína de péptidos que pueden estimular la actividad de las células T por medio de su presentación en moléculas MHC de clase II, llamadas “epítomos de células T”. Dichos epítomos de células T se definen comúnmente como cualquier secuencia de residuos aminoácido con la capacidad de unirse a moléculas MHC de clase II. Implícitamente, un “epítomo de células T” representa un epítomo que, cuando se une a moléculas MHC, puede ser reconocido por un receptor de células T (TCR), que al menos en principio, puede causar la activación de estas células T mediante el acoplamiento de un TCR para provocar una respuesta de dichas células T.

50

Las moléculas MHC de clase II son un grupo de proteínas altamente polimórficas que desempeñan un importante papel en la selección y activación de células T ayudantes. El grupo DR del antígeno de leucocito humano (HLA-DR) es el isotipo predominante de este grupo de proteínas; sin embargo, los isotipos HLA-DQ y HLA-DP realizan funciones similares. En la población humana, los individuos poseen de dos a cuatro alelos DR, dos alelos DQ y dos DP. Existen aproximadamente 70 alotipos diferentes para el isotipo DR, 30 alotipos diferentes para el DQ y 47 alotipos diferentes para el DP. Se ha resuelto la estructura de numerosas moléculas DR y éstas aparecen como un surco de unión de péptidos de extremo abierto, con numerosos bolsillos hidrófobos que se acoplan a residuos hidrófobos (residuos del bolsillo) del péptido [Brown *et al* *Nature* (1993) 364: 33; Stern *et al* (1994) *Nature* 368: 215]. La molécula MHC DR está formada por una cadena alfa y una beta que se insertan en sus C-terminales a través de la membrana celular. Cada heterodímero posee un dominio de unión al ligando que se une a péptidos que varían entre 9 y 20 aminoácidos de longitud, aunque el surco de unión puede acomodar un máximo de 11 aminoácidos. Las moléculas DQ han mostrado recientemente que tienen una estructura homóloga y se espera que las proteínas de la familia DP sean muy similares. La identificación del polimorfismo de los alotipos diferentes de la molécula de clase II contribuye a una amplia diversidad de superficies de unión para péptidos dentro del surco de unión de péptidos y a nivel de población asegura máxima flexibilidad con respecto a la capacidad de reconocer proteínas extrañas y producir una respuesta inmune a organismos patógenos.

65

Una respuesta inmune a una proteína terapéutica procede vía el camino de presentación del péptido MHC de clase II. Aquí, las proteínas exógenas se sumergen y se procesan para la presentación en asociación con moléculas MHC de clase II del tipo DR, DQ o DP. Las moléculas MHC de clase II son expresadas por células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, como macrófagos y células dendríticas, entre otros. El acoplamiento de un complejo peptídico MHC de clase II mediante un receptor de células T afín en la superficie de la célula T, junto con la unión entrecruzada de ciertos correceptores distintos, como la molécula CD4, puede inducir un estado activado dentro de la célula T. La activación conduce a la liberación de citoquinas, activando también otros linfocitos como las células B, para producir anticuerpos o activando células T asesinas como una respuesta inmune celular completa.

La identificación de epítomos de células T es el primer paso para la eliminación de epítomos; sin embargo, existen muy pocos casos claros en la técnica en los que la identificación de epítomos y la eliminación de los mismos se integren en un único esquema. Así, en las patentes WO98/52976 y WO00/34317 se presentan técnicas informáticas de hilo conductor para identificar secuencias de polipéptidos con el potencial de unirse a subconjuntos de alotipos humanos DR de MHC de clase II. En estas enseñanzas, los epítomos de células T previstos se eliminan mediante la sustitución juiciosa de aminoácidos dentro de la proteína de interés. Sin embargo, con este esquema y otros procedimientos informáticos para la identificación de epítomos [por ejemplo, Godkin, A.J. *et al* (1995) *J. Immunol.* **161**: 850-858; Sturniolo, T. *et al* (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**: 555-561], los péptidos que se había previsto que serían capaces de unirse a moléculas MHC de clase II pueden no funcionar como epítomos de células T en todas las situaciones, particularmente *in vivo* debido a los efectos de las vías de procesado u otros fenómenos. Además, los enfoques informáticos para la predicción de epítomos de células T, en general no son capaces de predecir epítomos con restricción DP o DQ, aunque en general hay coincidencia en el reconocimiento entre estos sistemas.

Además de las técnicas informáticas existen métodos *in vitro* para la medición de la capacidad de los péptidos sintéticos de unirse a moléculas MHC de clase II. Por ejemplo, un método usa líneas de células B de alotipo MHC definido como fuente de superficie de unión de MHC de clase II y se puede aplicar a la identificación de ligandos de MHC de clase II [Marshall, K.W. *et al* (1994) *J. Immunol.* **152**: 4946-4956; O'Sullivan *et al* (1990) *J. Immunol.* **145**: 1799-1808; Robadey, C. *et al* (1997) *J. Immunol.* **159**: 3238-3246]. Sin embargo, dichas técnicas no están adaptadas al cribado de múltiples epítomos potenciales frente a una amplia diversidad de alotipos de MHC, ni pueden confirmar la capacidad de un péptido de unión de funcionar como un epítomo de células T.

Recientemente se han empezado a usar técnicas que explotan los complejos solubles de moléculas MHC recombinantes en combinación con péptidos sintéticos [Kern, F. *et al* (1998) *Nature Medicine* **4**:975-978; Kwok, W.W. *et al* (2001) *TRENDS in Immunol.* **22**:583-588]. Estos reactivos y procedimientos se usan para identificar la presencia de clones de células T a partir de muestras de sangre periférica de sujetos humanos o de animales de experimentación que son capaces de unir complejos péptido-MHC particulares. Estos procedimientos tampoco se adaptan fácilmente al cribado de múltiples epítomos potenciales frente a una amplia diversidad de alotipos de MHC.

Los ensayos biológicos de activación de células T ofrecen una opción práctica para obtener una lectura de la capacidad de un péptido de ensayo, o de toda la secuencia de una proteína, para provocar una respuesta inmune. Los ejemplos de este tipo de enfoque incluyen el trabajo de Petra *et al*, que usa ensayos de proliferación de células T frente a la proteína bacteriana estafiloquinasa, seguido de mapeo de epítomos usando péptidos sintéticos para estimular líneas de células T [Petra, A.M. *et al* (2002) *J. Immunol.* **168**: 155-161]. De forma similar, los ensayos de proliferación de células T usando péptidos sintéticos de la proteína de la toxina del tétanos han tenido como resultado la definición de regiones inmunodominantes de la toxina [Reece, J.C. *et al* (1993) *J. Immunol.* **151**: 6175-6184]. En la patente WO99/53038 se expone un enfoque en el que los epítomos de células T en una proteína de ensayo se pueden determinar usando subconjuntos aislados de células inmunes humanas, provocando su diferenciación *in vitro* y el cultivo de las células en presencia de péptidos sintéticos de interés y la medición de cualquier proliferación inducida en las células T cultivadas. La misma técnica también es descrita por Stickler *et al* [Stickler, M.M. *et al* (2000) *J. Immunotherapy* **23**: 654-660], donde en ambos casos el método se aplica a la detección de epítomos de células T dentro de subtilisina bacteriana. Dicha técnica requiere la aplicación cuidadosa de técnicas de aislamiento celular y cultivo celular con múltiples suplementos de citoquina para obtener los subconjuntos deseados de células inmunes (células dendríticas, células T C4+ y/o CD8+) y no permite un cribado de rendimiento rápido usando múltiples muestras de donantes.

Como se describe más arriba y como consecuencia de ello, sería conveniente identificar y eliminar, o al menos reducir los epítomos de células T de un péptido, polipéptido o proteína originalmente inmunogénicos pero en principio terapéuticamente valiosos. Una de estas moléculas terapéuticamente valiosas es FVIII. La presente invención proporciona formas modificadas de FVIII humano con uno o varios epítomos de células T eliminados.

FVIII es un factor de coagulación dentro de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea. FVIII es un cofactor del factor IXa que, en presencia de iones calcio y fosfolípidos, convierte el factor X en la forma activada Xa. La genética molecular de FVIII está bien estudiada, al menos en los defectos en el gen de FVIII ligado a X que da origen a la hemofilia A. El gen FVIII codifica dos copias empalmadas alternativamente que dan origen a la isoforma A grande de la glicoproteína FVIII y a la isoforma B más pequeña. En estado nativo, se pueden identificar múltiples formas de degradación o procesado derivadas del precursor de la isoforma A y se han adscrito actividades funcionales particulares a fragmentos particulares. La molécula de FVIII está dividida en 6 dominios estructurales; un dominio A triplicado (A1, A2, A3), un dominio central rico en carbohidratos y prescindible (dominio B) y un dominio C duplicado (C1, C2). Los sitios de corte proteolítico de FVIII para la trombina y el factor Xa se encuentran tras los residuos 372, 740 y 1689. El corte para Xa junto con la proteína C activada se encuentra tras el residuo 336.

ES 2 319 758 T3

La proteína FVIII se puede definir funcionalmente como un factor capaz de corregir el defecto de coagulación en plasma derivado de pacientes afectados de hemofilia A. Para el tratamiento de la hemofilia A, se elabora FVIII en forma purificada a partir de plasma humano o porcino y más recientemente por tecnologías de ADN recombinante. En 1984, el gen del FVIII humano se aisló y se expresó en células de mamífero en al menos 2 grupos de laboratorio independientes [Toole, J. J., *et al.* (1984), *Nature* 312 342-347; Gitschier, J., *et al.* (1984), *Nature* 312: 326-330; Wood, W. I., *et al.* (1984), *Nature* 312 330-337; Vehar, G. A., *et al.* (1984), *Nature* 312: 337-342; WO87/04187; WO88/08035; WO88/03558; US, 4,757,006]. La secuencia de aminoácidos se dedujo de ADNc y se desarrollaron métodos para la producción recombinante de cantidades terapéuticas de FVIII, por ejemplo, en la patente US, 4,965,199 se publica un método para la producción de FVIII en células huésped de mamíferos y la purificación de FVIII humano. Se ha presentado la expresión de FVIII humano en células CHO (ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de cría de hámster), y más recientemente FVIII ha sido modificado para borrar parte o la totalidad del dominio B [U.S. Pat. N° 4,868,112] y dicha molécula ha mostrado eficacia en ensayos clínicos [Lusher, J.M. *et al* (2003) *Haemophilia* 9: 38-49]. De hecho, esta molécula esta registrada para su uso - Refacto se produce en células CHO mediante la colaboración entre Genetics Institute y Farmacia Upjohn.

A pesar de la disponibilidad de cantidades terapéuticas de FVIII, hay una necesidad continua de análogos de FVIII con propiedades mejoradas. Las mejoras deseadas incluyen esquemas alternativos y modalidades para la expresión y purificación de la proteína, pero también mejoras en las propiedades biológicas de la proteína. En particular es necesario mejorar las características *in vivo* cuando se administra como agente terapéutico. A este respecto, se desea especialmente obtener FVIII con un potencial reducido o nulo de inducir una respuesta inmune en el sujeto humano. Cabe esperar que dichas proteínas mostraran un incremento del tiempo de circulación en el sujeto humano y fueran particularmente beneficiosas en un escenario de enfermedad crónica y recurrente, como en los casos de hemofilia A, en particular en casos donde los hemofílicos pueden ser sensibles a factor VIII recombinante exógeno y de otro modo desarrollarían anticuerpos anti-factor VIII que limitarían la eficacia de su tratamiento.

Otros han obtenido moléculas de FVIII y en particular de FVIII modificado de forma recombinante [US 4,757,006; US 5,633,150; US 5,668,108], pero ninguno de estos estudios reconoce la importancia de los epítomos de células T en las propiedades inmunogénicas de la proteína ni conciben influir directamente en estas propiedades de forma específica y controlada, según el esquema de la presente invención.

Algunos ejemplos de la técnica para la modificación de FVIII son la patente US 5,948,407 donde se dan a conocer esquemas para producir formulaciones que permiten la administración vía mucosa (por ejemplo, oral) de la proteína con el propósito de evocar un repertorio de células T supresoras frente al antígeno de la proteína terapéutica.

Otros han intentado modificaciones de FVIII con la finalidad de mejorar la vida media *in vivo* en el sujeto hemofílico, por ejemplo, en la patente US 6,037,452 se describen conjugados de poli(óxido de alquileo) y factor VIII.

Una complicación particular en la terapia de la hemofilia A es la inducción en ciertos pacientes de anticuerpos inhibidores frente a la preparación FVIII administrada. Se han avanzado varias estrategias para superar la respuesta inmunológica a FVIII en hemofílicos. La terapia de inducción de tolerancia es uno de dichos enfoques, pero actualmente requiere la administración muy temprana en la vida de un hemofílico de dosis muy grandes (y costosas) de preparación FVIII. Este enfoque sólo tiene éxito para alcanzar la tolerancia en una parte de los casos [Colowick, A. B. *et al* (2000) *Blood* 96: 1698-1702]. Algunos ensayos clínicos de dos productos recombinantes diferentes en sujetos no tratados previamente indican que el inhibidor se desarrolla en aproximadamente el 20% de los casos [Lusher, J. M. *et al* (1993) *N. Engl. J. Med.* 328: 453-459; Bray, G.L. *et al* (1994) *Blood* 83: 2428-2435]. Los inhibidores de FVIII son anticuerpos inmunoglobulina que neutralizan la actividad de FVIII en el plasma. Los inhibidores se presentan como aloanticuerpos en aproximadamente el 25% de los pacientes con hemofilia A severa y entre el 5% y el 15% de los pacientes con la variante leve o moderada de esta enfermedad, que son tratados con concentrados de FVIII o FVIII recombinante.

Para pacientes con inhibidores también se usa el tratamiento con complejo de factor IX o "complejo protrombina". En general, éstas son mezclas de múltiples factores diferentes, como por ejemplo, los factores II, VII, IX y X. En la patente EP 0044343-B1 se expone dicho complejo protrombina que presenta un componente activado (FVIIa). De forma similar, el documento US 6,358,534 describe un complejo protrombina inmunotolerante que comprende una baja proporción de proteína FVIII y proporciones relativamente elevadas de otras proteínas factores de coagulación y proteínas portadoras.

La patente US 5,543,145 presenta composiciones para la supresión de la producción del inhibidor de FVIII, que comprenden anticuerpos policlonales o monoclonales, por ejemplo, en forma de F(ab')₂ mezclado con FVIII. En la patente US 4,769,336 se presentan fragmentos de FVIII que se unen a los inhibidores de anticuerpos de FVIII y por consiguiente los bloquean.

Otras estrategias incluyen el uso de factor VIII porcino en lugar de FVIII humano, aunque dicho tratamiento es una medida temporal, ya que el propio FVIII porcino es inmunogénico.

Otras opciones disponibles incluyen el tratamiento con fármacos inmunosupresores y/o la eliminación de inhibidores de la circulación mediante tratamientos extracorporales y, como es lógico, dichos métodos representan soluciones extremas y arriesgadas del problema tratado.

ES 2 319 758 T3

Las técnicas de ingeniería genética ofrecen un amplio campo para la modificación e incluso para la producción de moléculas de FVIII para uso terapéutico. Las composiciones farmacéuticas y el tratamiento de la hemofilia A se presentan en los estudios de las patentes US 4,965,199; US 5,618,788 y US 5,668,108 y equivalentes extranjeras, y se deben considerar como ejemplos de una gran cantidad de trabajos sobre este tema de los que dispone el estado actual de la técnica.

Otros ejemplos de tipos de modificación de FVIII realizadas usando enfoques recombinantes se presentan en las patentes US 5,859,204; US 6,376,463; US 6,485,563 y US 6,180,371 que de forma colectiva proporcionan proteínas FVIII y sus genes codificantes en los que sustituciones específicas del sitio han dado como resultado la reducción de la reactividad frente a un anticuerpo inhibidor. En estos estudios particulares, las sustituciones están confinadas a los aminoácidos 484-509 del dominio A de FVIII. Dichas modificaciones, al cambiar la topología de la superficie de la molécula de FVIII de modo que los epítomos conformacionales particulares ya no son reconocibles por anticuerpos particulares con reactividad cruzada en el suero del paciente, no dirigen los epítomos de células T subyacentes necesarios para conducir la producción de anticuerpos de las células B.

Otros han usado medidas de ADN recombinante para producir moléculas de FVIII modificadas usando sustituciones de aminoácidos específicas del sitio [WO87/07144] o cambio de dominios entre moléculas relacionadas. Un ejemplo de este último enfoque se presenta en la patente WO90/05530, en el que se produce una molécula de FVIII que contiene el dominio B del factor V humano en lugar del dominio B de FVIII.

Otros han presentado igualmente preparaciones químicas de FVIII que comprenden moléculas de FVIII recombinantes diseñadas para contener dominios de secuencia derivados de humanos y porcinos (y de otras especies). Dichas moléculas híbridas se describen en las patentes US 5,744,446; US 5,663,060; US 5,583,209; US 5,364,771; US 5,888,974 y otras.

En el documento US 5,171,844 se exponen moléculas de FVIII manipuladas genéticamente, que pueden tener actividad mejorada y/o inmunogenicidad reducida. Esta última propiedad se refiere a la ausencia de secciones de la molécula por delección. El trabajo previo descrito en la patente US 4,868,112 y en equivalentes extranjeras proporciona mutantes de delección funcionales de FVIII sin el dominio B.

Otras modificaciones de ingeniería genética de la proteína FVIII tenían por finalidad mejorar el proceso de producción de la proteína y en la patente US 6,271,025 se presentan ejemplos particulares. Este caso se presenta a manera de ejemplo de la gran cantidad de trabajos similares disponibles y conocidos en la técnica.

Resumen y descripción de la invención

La presente invención proporciona formas modificadas del factor VIII humano, denominado aquí "FVIII", en las que la característica inmune se modifica mediante la reducción o eliminación de varios epítomos potenciales de células T.

La invención da a conocer secuencias identificadas dentro de la secuencia primaria de FVIII que son epítomos potenciales de células T en virtud del potencial de unión de MHC de clase II. Asimismo, este descubrimiento se refiere específicamente a la proteína FVIII completa humana en isoforma A de 2332 residuos aminoácido y a una versión más pequeña en la que el dominio B no está presente en la proteína.

La invención da a conocer también posiciones específicas dentro de la secuencia primaria de la molécula, que de acuerdo con la invención se tienen que alterar mediante la sustitución, adición o delección de aminoácidos específicos, manteniendo a la vez el máximo grado de actividad biológica de la proteína. En aquellos casos en que la pérdida de inmunogenicidad se puede conseguir sólo mediante una pérdida simultánea de actividad biológica, es posible restablecer la actividad mediante otras alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Además, la invención da a conocer métodos para producir dichas moléculas modificadas y sobretodo, métodos para identificar los epítomos de células T que requieren alteración en el orden para reducir o eliminar los sitios inmunogénicos.

La presente invención presenta formas modificadas de proteínas FVIII que se espera que posean propiedades *in vivo* mejoradas. La presente invención da a conocer las regiones principales de la secuencia primaria de FVIII que son inmunogénicas en el hombre y ofrece modificaciones en las secuencias para eliminar o reducir la eficacia inmunogénica de estos sitios. En una realización, los péptidos sintéticos que comprenden las regiones inmunogénicas se pueden introducir en composiciones farmacéuticas con la finalidad de producir una respuesta tolerogénica a toda la molécula.

En otra realización, las moléculas de FVIII modificadas de la presente invención se pueden usar en composiciones farmacéuticas.

ES 2 319 758 T3

En resumen, la invención se refiere a:

una molécula modificada que tiene la actividad biológica de FVIII y que sustancialmente es no inmunogénica o menos inmunogénica que cualquier molécula no modificada con la misma actividad biológica cuando se usa *in vivo*;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que dicha pérdida de inmunogenicidad se alcanza eliminando un epítipo de células T derivado de la molécula originalmente no modificada;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que dicha pérdida de inmunogenicidad se consigue mediante la reducción de varios alotipos de MHC capaces de unirse a péptidos derivados de dicha molécula;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que se elimina un epítipo de células T;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que dichos epítipos de células T presentes originalmente son secuencias de péptidos o ligandos de MHC de clase II que muestran la capacidad de estimular o unir células T vía presentación en clase II;

a) una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que dicha secuencia de péptidos es MSSSPHVLNRNAQSG,

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que está alterado un residuo aminoácido del epítipo de células T presente originalmente;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que la alteración de los residuos aminoácido es la sustitución del/de los residuo(s) presente(s) originalmente por otro(s) residuo(s) aminoácido en posición(es) específicas;

una molécula especificada de acuerdo con lo anterior, en la que si es necesario se realizan otras alteraciones, usualmente por sustitución, adición o delección de aminoácido(s) específico(s) para restablecer la actividad biológica de dicha molécula;

una molécula de FVIII especificada de acuerdo con lo anterior, en la que la sustitución de aminoácidos se realiza en la posición V7 del péptido superior correspondiente a la posición V823 en la secuencia salvaje según la secuencia borrada del dominio B (Figura 9);

una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los péptidos o péptidos modificados de arriba, con la actividad de unión a MHC de clase II

una secuencia o molécula de ADN que codifica para cualquiera de las moléculas modificadas especificadas, como se define anteriormente y a continuación;

una composición farmacéutica que comprende una molécula modificada con la actividad biológica de FVIII

una composición farmacéutica como la que se define más arriba y/o en las reivindicaciones, opcionalmente junto a una carga, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

El término “epítipo de células T” representa, según la idea de esta invención, una secuencia de aminoácidos que es capaz de unir MHC de clase II, capaz de estimular células T y/o también es capaz de unir (sin necesariamente una activación que se pueda medir) células T en complejos con MHC de clase II.

El término “péptido”, como se usa aquí y en las reivindicaciones subordinadas, es un compuesto que incluye dos o más aminoácidos. Los aminoácidos están unidos mediante un enlace peptídico (definido aquí abajo). Existen 20 aminoácidos diferentes que se encuentran de forma natural relacionados en la producción biológica de péptidos, y cualquier número de ellos puede estar unido en cualquier orden para formar una cadena o un anillo peptídico. Los aminoácidos presentes de forma natural empleados en la producción biológica de los péptidos tienen todos la configuración L. Los péptidos sintéticos se pueden preparar empleando métodos sintéticos convencionales, utilizando L-aminoácidos, D-aminoácidos, o varias combinaciones de aminoácidos de las dos configuraciones diferentes. Algunos péptidos contienen sólo unas pocas unidades de aminoácido. Los péptidos cortos, por ejemplo, con menos de diez unidades aminoácido, a veces se denominan “oligopéptidos”. Otros péptidos contienen un gran número de residuos aminoácido, por ejemplo, 100 o más, y se denominan “polipéptidos”. Por convención, se puede considerar “polipéptido” cualquier cadena peptídica que contenga tres o más aminoácidos, mientras que generalmente se considera que un “oligopéptido” es un tipo particular de polipéptido “corto”. Así, se entiende que cualquier referencia a un “polipéptido”, como se usa aquí, incluye también un oligopéptido. Además, cualquier referencia a “péptidos” incluye polipéptidos, oligopéptidos y proteínas. Cada disposición diferente de aminoácidos forma diferentes polipéptidos o proteínas. El número de polipéptidos -y por tanto el número de proteínas diferentes- que se pueden formar es prácticamente ilimitado. “Carbono alfa ($C\alpha$)” es el átomo de carbono del componente carbono hidrógeno (CH) que se encuentra en la cadena peptídica. Una “cadena lateral” es un grupo que cuelga de $C\alpha$, que puede comprender un grupo o mitad simple o complejo, con dimensiones físicas que pueden variar significativamente en comparación con las dimensiones del péptido.

ES 2 319 758 T3

La invención se puede aplicar a cualquier especie FVIII de la molécula que tenga sustancialmente las mismas secuencias primarias de aminoácidos que la publicada aquí y por tanto incluiría moléculas de FVIII derivadas de medidas de ingeniería genética u otros procesos y puede contener más o menos de 2332 residuos aminoácido.

5 Una especie FVIII de la molécula particularmente preferida es una en la que falta el dominio B de la molécula y también comprende incluso una o varias sustituciones de aminoácidos en cualquiera de los dominios restantes para dar como resultado la eliminación de la secuencia de uno o varios epítomos de células T. Una molécula de FVIII terapéutica con el dominio B eliminado, de 1438 residuos aminoácido ha sido objeto de ensayos clínicos exitosos, como se describe en Lusher *et al* y sus referencias [Lusher, J. M. *et al* (2003) *Haemophilia* 9: 38-49]. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se representa aquí en la Figura 9.

Las proteínas FVIII, como las identificadas de otras fuentes de mamíferos, tienen en común muchas de las secuencias peptídicas de la presente descripción y tienen en común muchas secuencias peptídicas con sustancialmente la misma secuencia que las del listado de esta descripción. Por tanto, dichas secuencias de proteínas forman parte igualmente del ámbito de la presente invención.

La invención se ha concebido para superar el hecho de que en la práctica, las proteínas solubles introducidas en organismos autólogos pueden desencadenar una respuesta inmune dando como resultado el desarrollo de anticuerpos del huésped que se unen a la proteína soluble. Para muchos pacientes con hemofilia A, las respuestas de anticuerpos contra las preparaciones terapéuticas existentes de FVIII son un problema importante en la gestión de su enfermedad. En cualquier individuo, un pequeño número de epítomos de células T puede conducir a la señalización de células T ayudantes, dando como resultado respuestas mantenidas del anticuerpo ante muchísimas superficies reconocidas de células B expuestas, determinantes de la proteína FVIII nativa. El análisis de los genes que codifican anticuerpos inhibidores de pacientes de hemofilia A ha mostrado que muchos de estos anticuerpos han sufrido maduración de afinidad [Jacquemin, M. G. *et al* (1998) *Blood* 92: 496-506; van den Brink, E. N *et al* (2000) *Blood* 95: 558-563]. El fenómeno de la hipermutación subyacente a la maduración de afinidad ocurre sólo en las células B en respuesta a la ayuda de células T. Hace tiempo se reconoció que una elevada proporción de anticuerpos inhibidores de FVIII son de la subclase IgG4 [Andersen, B. R. y Terry, W. D. (1968) *Nature* 217: 174-175], y de forma similar, las reacciones necesarias para el cambio entre clases son eventos que dependen de las células T ayudantes. Otra evidencia de que la respuesta de los anticuerpos a FVIII es conducida por células T es que se ha observado que en pacientes VIH positivos con inhibidores de FVIII, se pierde la respuesta de los anticuerpos de FVIII porque se reduce el número de células T [Bray, G. L. *et al* (1993) *Am. J. Hematol.* 42: 375-379]. Por consiguiente, la presente invención intenta corregirlo proporcionando proteínas FVIII con propensión alterada a producir una respuesta inmune en la administración al huésped humano. Se conoce que donde la multiplicidad de epítomos de células B permanece intacta en la superficie de FVIII modificado, en ausencia de ayuda continuada de células T, los títulos del inhibidor se reducen considerablemente y esta terapia no se indica para nuevos pacientes.

Según los métodos descritos aquí, los inventores han descubierto las regiones de la molécula de FVIII que comprenden los epítomos de células T críticos que conducen las respuestas inmunes a esta proteína.

El método general de la presente invención que conduce a FVIII modificado comprende las etapas siguientes:

- (a) determinación de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos o parte de ellos;
- 45 (b) identificación de uno o varios epítomos de células T potenciales dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante un método que incluye la determinación de la unión de los péptidos a moléculas MHC usando técnicas *in vivo* o *in silico* o ensayos biológicos;
- (c) diseño de nuevas variantes de secuencias con uno o varios aminoácidos dentro de los potenciales epítomos de células T identificados, modificados de tal forma que reducen sustancialmente o eliminan la actividad de los epítomos de células T mediante la unión de los péptidos a moléculas MHC usando técnicas *in vivo* o *in silico* o ensayos biológicos. Dichas variantes de secuencia se crean de tal modo que evitan la creación de nuevos epítomos de células T potenciales por variaciones de la secuencia, a menos que dichos nuevos epítomos de células T potenciales estén a su vez modificados de tal forma que reduzcan sustancialmente o eliminen la actividad de los epítomos de células T; y
- 55 (d) construcción de dichas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y análisis de dichas variantes para identificar una o más variantes con propiedades deseables según técnicas recombinantes bien conocidas.

La identificación de potenciales epítomos de células T según la etapa (b) se puede llevar a cabo según métodos ya descritos. Los métodos apropiados se publican en las patentes WO 98/59244 WO 98/52976, WO 00/34317, y WO 02/069232, y se pueden usar para identificar la propensión de unión de péptidos derivados de FVIII a una molécula MHC de clase II. En la práctica, las composiciones incluidas en la presente invención se han obtenido con la aplicación conjunta de ensayos biológicos *ex vivo* de proliferación de células T humanas y una herramienta de software que explota el esquema que se describe en la patente WO 02/069232 y que es una realización de la presente invención.

El software simula el proceso de presentación de antígeno a nivel de la interacción de unión del péptido MHC de clase II para proporcionar un valor de unión para cualquier secuencia peptídica dada. Dicho valor se determina para muchos de los alotipos predominantes de MHC de clase II existentes en la población. Como este esquema es aplicable al análisis de cualquier secuencia peptídica, se pueden predecir las consecuencias de las sustituciones, adiciones o 5 deleciones de aminoácidos con respecto a la capacidad de un péptido de interactuar con un surco de unión de MHC de clase II. Por consiguiente, se pueden diseñar nuevas composiciones de secuencias que contienen un número reducido de péptidos capaces de interactuar con MHC de clase II y por tanto funcionar como epítomos inmunogénicos de células T. Mientras el ensayo biológico, usando cualquier muestra de donante, puede evaluar la unión de un máximo de 4 alotipos DR, el proceso *in silico* puede analizar la misma secuencia peptídica usando > 40 alotipos simultáneamente. 10 En la práctica, este enfoque permite dirigir el diseño de nuevas variantes de secuencias que están comprometidas en su capacidad de interactuar con múltiples alotipos de MHC.

Los resultados de un análisis realizado en la secuencia completa de FVIII humano se presentan en la Figura 1 a modo de ejemplo de este enfoque *in silico*. Aquí se presenta una lista de secuencias peptídicas 13meras derivadas 15 de FVIII en las que se ha detectado la capacidad de unir uno o varios alotipos de MHC de clase II con un valor de unión significativo. Tomado en su totalidad, se considera que este conjunto de datos de péptidos 13meros proporciona, con alto grado de certeza, el universo de ligandos permisibles de MHC de clase II para la proteína FVIII humana. Por razones como el requerimiento para el procesamiento proteolítico del polipéptido FVIII completo y otras etapas fisiológicas que conducen a la presentación de péptidos FVIII *in vivo*, resulta claro que finalmente sólo tendrá relevancia biológica 20 un subconjunto relativamente menor del repertorio completo de péptidos. Para seguir identificando dichos péptidos con relevancia biológica, los inventores han desarrollado un enfoque que explota ensayos *ex vivo* de proliferación de células T humanas.

Este enfoque ha demostrado ser un método particularmente eficaz y se publica aquí como una realización de la 25 invención. El método se puede aplicar al ensayo de parte de la secuencia, por ejemplo una proteína FVIII a la que le falta la totalidad o una parte del dominio B; el método se puede aplicar a regiones seleccionadas de la secuencia, por ejemplo, a subconjuntos de péptidos FVIII, como todos o varios de los listados en la Figura 1; o el método se puede aplicar al ensayo de la totalidad de la secuencia FVIII. En los presentes estudios, el método incluye el ensayo de secuencias peptídicas superpuestas derivadas de FVIII en un esquema para el cribado y análisis de una secuencia 30 de FVIII sin el dominio B. Se analiza la capacidad de los péptidos sintéticos para provocar una respuesta proliferativa en células T humanas cultivadas *in vitro*. Mientras este tipo de método se realiza usando células T humanas nativas tomadas de donantes sanos, los inventores han establecido que en la realización de dicho ensayo, un índice de estimulación igual o superior a 2,0 resulta una medida útil de la proliferación inducida. El índice de estimulación se obtiene normalmente de dividiendo el valor de proliferación (por ejemplo, cuentas por minuto de radioactividad si se 35 usa incorporación de ³H-timidina) medido en el péptido de ensayo entre el valor medido en células que no han tenido contacto con un péptido de ensayo.

En otra realización de este enfoque, los inventores avanzan un método en el que se criba la secuencia FVIII buscando la presencia y la situación de epítomos de células T usando ensayos biológicos *ex vivo* de células T, donde 40 las células T derivan de pacientes hemofílicos. Para una parte de dichos pacientes, la proteína FVIII constituye una proteína extraña y un potente antígeno *in vivo*. Los inventores han establecido que es posible obtener líneas de células T policlonales y en principio monoclonales *in vitro* a partir de PBMC de dichos individuos y estas líneas se pueden usar como reactivos eficaces en el mapeo de epítomos de células T dentro de la proteína FVIII.

Para ello las células T de PBMC hemofílicas se someten a varias series de estimulación con antígeno (FVIII) *in vitro* seguidas inmediatamente por la expansión en presencia de IL-2. Para establecer líneas policlonales de células T, generalmente fueron suficientes 2-3 series de estimulación con antígeno para generar un gran número de células 45 específicas de antígeno y dichas células se pueden almacenar criogénicamente para su uso posterior en caso necesario. Las células se usaron para cribar un gran número de péptidos sintéticos.

En el presente caso, los péptidos sintéticos se analizaron usando un sistema de mezclas, cada una de las cuales contenía ocho secuencias peptídicas diferentes. El esquema de la mezcla de péptidos se ilustra en la Figura 2. Tras la ronda inicial de estimulación con antígeno (FVIII), que comprende la coincubación de FVIII y PBMC durante 7 días, se llevó a cabo la reexposición posterior con el antígeno en presencia de PBMC autólogo irradiado como células 50 presentadoras de antígeno. Estas series de selección de antígeno se realizan durante 3 a 4 días y se entremezclan con fases de expansión que comprenden la estimulación con IL-2 que se puede añadir cada 3 días durante un periodo total de unos 9 días. La reexposición final se realiza usando células T que han sido "reanalizadas", es decir, células T que no han sido estimuladas por IL-2 durante unos 4 días. Estas células se estimulan con antígeno (por ejemplo, péptido sintético o la proteína completa) usando de preferencia células autólogas presentadoras de antígeno como 55 previamente, durante unos 4 días y a continuación se mide la posterior respuesta proliferativa (en su caso). La mezcla de péptidos se organiza de forma que cada mezcla contenga péptidos que se solapan con la mezcla siguiente. De esta forma cualquier epítomo de células T individual está representado en 2 mezclas separadas y la proliferación inducida será detectada por medio de tratamientos que usen ambas mezclas. Cuando se detecta una respuesta proliferativa a cualquier mezcla peptídica determinada, la mezcla peptídica se decodifica repitiendo el ensayo, usando por separado 60 los distintos miembros de la mezcla.

En el marco de este sistema ha sido particularmente deseable explotar muestras de PBMC de la clase de los denominados "pacientes inhibidores", de forma que el mapa de epítomos de la proteína FVIII definido por el repertorio

ES 2 319 758 T3

de células T de estos individuos fuera representativo de la mayoría de epítomos corrientes de péptidos que son capaces de la presentación en el contexto *in vivo*. En este sentido, las PBMC de pacientes en los que existe una respuesta inmune demostrada previamente constituyen los productos de una etapa cebadora *in vivo* y en ellas podría haber una esperanza de beneficio práctico, al tener la capacidad de una magnitud mucho mayor de respuesta proliferativa a cualquier péptido estimulante dado. De este modo se reduce la dificultad técnica de realizar una medición de la proliferación.

Los presentes estudios han descubierto 38 secuencias peptídicas capaces de provocar una respuesta proliferativa importante (es decir, $SI > 2,0$). Estos péptidos se enumeran en la Tabla 1 y son una realización de esta invención. Dentro de este conjunto de péptidos se ha identificado otro subconjunto de péptidos que provocan una respuesta proliferativa importante en 2 o más muestras de donantes individuales y, de hecho, en algunas de estas respuestas, su magnitud ha sido significativamente superior a $SI = 2,0$. Estos péptidos se presentan en la lista de la Tabla 2 y constituyen otra realización de la invención.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 758 T3

TABLA I

	Secuencia peptídica	Residuo n^o*
5	ATRRYYLGAVELSWD	1
	SWDYMQSDLGELPVD	13
	PVDARFPPRVPKSEF	25
10	SVVYKKTLEFVEFTDH	43
	VEFTDHLFNIKPRP	52
	PWMGLLGPTIQAEVY	67
15	LKNMASHPVSLHAVG	88
	VSYWKASEGAEYDDQ	103
	PGGSHTYVWQVLKEN	130
20	ASDPLCLTYSYLSHV	148
	ILLFAVFDEGKSWHS	196
	SLPGLIGCHRKSVYW	241
25	VYWHVIGMGTTPEVH	253
	QASLEISPITFLTAQ	283
	YIAAEEEDWDYAPLV	385
30	SYKSQYLNNGPQRIG	406
	GPQRIGRKYKKVRFM	415
	PYNIYPHGITDVRPL	472
35	YKWTVTVEDGPTKSD	511
	KESVDQQRGNQIMSDK	556
40	QIMSDKRNVILFSVF	565
	PAGVQLEDPEPQASN	598
	ASNIMHSINGYVFDS	610
45	LQLSVCLHEVAYWYI	625
	VAYWYILSIGAQTDF	634
	GAQTDFLSVFFSGYT	643
50	GCHNSDFRNRGMTAL	691
	TGDYYEDSYEDISAY	712
	LLSKNNAIEPRFSQ	728
55	MSSSPHVLNRNQSG	817
	NEHLGLLGPYIRAEV	859
	AWAYFSDVDLEKDVH	940
60	CNIQMEDPTFKENYR	1009
	IGEHLHAGMSTLFLV	1108
	STLFLVYSNKCQTPL	1117
65	ISQFIIMYSLDGKKW	1204
	IARYIRLHPHYSIR	1251

ES 2 319 758 T3

RLHPTHYSIRSTLRM	1256
-----------------	------

* Numeración de la secuencia según la secuencia sin dominio B (FIGURA 9)

TABLA 2

Secuencias peptídicas FVIII capaces de estimular células T humanas ex vivo procedentes de 2 o más muestras de donantes

Péptido n°	Residuo n°*	Secuencia peptídica	Dominio
P1	196	ILLFAVFDEGKSWSH	A1
P2	406	SYKSQYLNNGPQRIG	A2
P3	415	GPQRIGRKYKKVRFM	A2
P4	511	YKWTVTVRDGPTKSD	A2
P5	610	ASNIMHSINGYVFDS	A2
P6	634	VAYWYILSIGAQTDF	A2
P7	817	MSSSPHVLNRRAQSG	A3
P8	1009	CNIQMEDPTFKENYR	A3
P9	1117	STLFLVYSNKCQTPL	A3
P10	1204	ISQFIIMYSLDGKKW	C1
P11	1251	IARYIRLHPTHYSIRSTLRM	C1

* Numeración de la secuencia según la secuencia sin dominio B (FIGURA 9)

Las secuencias peptídicas publicadas aquí representan la información crítica necesaria para la construcción de moléculas de FVIII modificadas en las que uno o varios de estos epítomos se encuentran comprometidos. Según la presente invención, los epítomos están comprometidos por mutación, dando como resultado secuencias que ya no son capaces de funcionar como epítomos de células T. Es posible usar métodos de ADN recombinante para conseguir mutagénesis dirigida de las secuencias diana y muchas de estos procedimientos están disponibles y son bien conocidos por la técnica.

Aunque el objetivo de esta invención es modificar las secuencias de aminoácidos de al menos uno o varios de los péptidos enumerados en la Tabla 1, se prefiere modificar las secuencias de uno o varios de los péptidos P1 - P11 identificados en la Tabla 2. Aquí se publican modificaciones apropiadas que consiguen el doble objetivo de reducir o eliminar la capacidad de la secuencia peptídica del sujeto para funcionar como un epítomo de células T, bien al nivel de ser un ligando para uno o varios alotipos de MHC de clase II, o especialmente siendo capaz de inducir la proliferación de células T y especialmente cuando las células T son células T humanas cultivadas *in vitro*.

Un ejemplo de dicho conjunto de modificaciones preferidas se obtiene mediante la ruptura del epítomo de células T comprendido por el péptido P10 con la secuencia ISQFIIMYSLDGKKW. Este epítomo mapea el dominio C1 de FVIII y a modo de ejemplo es un epítomo capaz de evocar la proliferación de células T *ex vivo* obtenidas de sangre hemofílica y las células de individuos no hemofílicos sanos.

Guiados por los resultados del análisis *in silico* de esta secuencia peptídica con respecto a su actividad como ligando de MHC de clase II, se han aplicado procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio para producir sustituciones en los residuos F1207, I1208, I1209 y M1210. La numeración de los residuos se hace conforme a la secuencia FVIII madura sin el dominio B (Figura 9). La mutagénesis en F1207 tuvo como resultado la pérdida de la expresión de FVIII y no se empleó actividad detectable en los ensayos. Por el contrario, se produjeron moléculas de FVIII activas incluyendo las sustituciones I1208A o I1208T o I1208N y/o I1209C y/o M1210K o M1210N. Por consiguiente, las proteínas FVIII

ES 2 319 758 T3

activas con una o varias de las sustituciones listadas arriba son composiciones preferidas según la presente invención. Se prefieren en particular las sustituciones I1208A, I1209C, M1210K o M1210N y dichas proteínas FVIII sustituidas son otras realizaciones de la invención.

5 De forma similar, las realizaciones preferibles comprenden moléculas FVIII que contienen sustituciones dentro del epítipo de células T comprendidas por el péptido P8 con la secuencia CNIQMEDPTFKENYR. Este epítipo mapea el dominio A3 de la proteína FVIII. Se han aplicado a esta secuencia procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio y se han establecido las sustituciones M1013K, I1011A o C o D o E o G o H o K o P o Q o R o S o T para obtener una molécula con actividad funcional retenida con respecto a los ensayos de Coatest y los parámetros inmunológicos *in silico* y los ensayos inmunológicos *in vitro*. Por ende, las moléculas FVIII que incluyen las sustituciones M1013K, I1011A o C o D o E o G o H o K o P o Q o R o S o T son otras realizaciones de la invención.

15 De forma similar, las realizaciones preferidas comprenden moléculas de FVIII que contienen sustituciones dentro del epítipo de células T comprendidas por el péptido P7 con la secuencia MSSSPHVLNRNAQSG. Este epítipo también mapea el dominio A3 de la proteína FVIII. La sustitución en la posición V823 se considera una modificación especialmente deseada y es una realización de la invención. Se han aplicado a esta secuencia procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio y se han establecido las sustituciones V823A, o D o E o G o H o N o P o S o T para proporcionar una molécula con actividad funcional retenida con respecto al ensayo de Coatest y los parámetros inmunológicos *in silico* y los ensayos inmunológicos *in vitro*. Las moléculas FVIII que incluyen las sustituciones V823A, 20 o D o E o G o H o N o P o S o T son otras realizaciones de la invención.

Otro ejemplo de una secuencia peptídica de epítipo de células T que demuestra ser activa en muestras de sangre hemofílica lo constituye el péptido P11 con la secuencia IARYIRLHPTHYSIRSTLRM. Este epítipo mapea el dominio C1 de la proteína FVIII y ha sido identificado previamente como un conductor importante de la producción de inhibidor de FVIII [Jacquemin M. *et al* (2003) *Blood* 101: 1351-1358]. Las sustituciones en las posiciones Y1254, I1255, L1257, Y1262, I1264, L1268 se consideran modificaciones especialmente deseables y son una realización de la invención.

30 De forma similar, otras realizaciones preferibles comprenden moléculas de FVIII que contienen sustituciones en las posiciones L1119, F1120, L1121, V1122 e Y1123 del epítipo comprendido por el péptido P9 (STLFLVYSNKCCQ TPL) también las sustituciones en las posiciones Y636, Y638, I637, L638 e I639 del epítipo comprendido por el péptido P6 (VAYWYILSIGAQTDF); sustituciones en las posiciones I613 e I617 del epítipo comprendido por el péptido P5 (ASNIMHSINGYVFDS); sustituciones en las posiciones V515 y V517 del epítipo comprendido por el péptido P4 (YKWTVTVRDGPSTSD); sustituciones en la posición I419 del epítipo comprendido por el péptido P3 (GPQRI GRKYKKVRFM); sustituciones en las posiciones Y407, Y411 y L412 del epítipo comprendido por el péptido P2 (SYKSQYLNNQPQRIG) y sustituciones en las posiciones L197, L198, F199, V201 y F202 del epítipo comprendido por el péptido P1 (ILLFAVFDEGKSWSH).

40 De acuerdo con lo anterior se puede observar que según esta invención se pueden producir numerosas variantes de proteínas FVIII y se pueden analizar para encontrar las características inmunes y funcionales deseadas. En los EJEMPLOS se describen métodos para la elaboración y el análisis de dichas proteínas variantes de FVIII. Todas estas proteínas funcionales son realizaciones de la presente invención. Además, las modificaciones realizadas han demostrado dar como resultado secuencias peptídicas incapaces de unirse a moléculas MHC de clase II con la misma avidéz que las secuencias peptídicas originales o "salvajes" (wt, del inglés wild-type) usando la herramienta predictiva *in silico* de unión de MHC de clase II de la patente WO02/069232. Además, el análisis físico de los epítopos de variantes de péptidos del ejemplo, usando ensayos biológicos *ex vivo* de proliferación de células T humanas confirma la pérdida deseada de capacidad de estos péptidos de soportar la proliferación de células T y por tanto de funcionar como epítopos de células T. En el presente caso se incluyen las secuencias peptídicas identificadas usando ensayos biológicos y en consecuencia confirmadas como capaces de soportar la activación de células T. Significativamente, 45 varios de dichos péptidos son capaces de provocar la proliferación *in vitro* de células T derivadas de sangre hemofílica, por consiguiente son representativos de los epítopos procesados y no se pueden considerar determinantes crípticos o inmunológicamente irrelevantes.

55 Las proteínas variantes se producirán de forma más preferible mediante técnicas de ADN recombinante aunque se pueden contemplar otros procedimientos, incluida la síntesis química de fragmentos de FVIII. Un procedimiento sencillo consiste en utilizar la información de la secuencia de proteínas que se presenta aquí para deducir polinucleótidos (ADN) codificantes de cualquiera de las moléculas o fragmentos de la variante preferida de FVIII. Esto se consigue más fácilmente usando herramientas de software informático, como el software DNASTAR [DNASTAR Inc. Madison WI, USA] o un software similar. Cualquiera de estas secuencias de ADN codificante de polipéptidos de la presente 60 invención u homólogos importantes de ellos se deben considerar como realizaciones de esta invención.

La invención se refiere a análogos de FVIII en los que las sustituciones de al menos un residuo aminoácido se han realizado en posiciones que dan como resultado una eliminación o una reducción sustancial de la actividad de uno o varios epítopos de células T potenciales de la proteína. Una o varias sustituciones de aminoácidos en puntos particulares dentro de cualquiera de los ligandos MHC de clase II potenciales identificados en la Figura 1 o de preferencia 65 secuencias peptídicas de epítopos de las Tablas 1 y 2 pueden tener como resultado una molécula de FVIII con un potencial inmunogénico reducido cuando se administra como terapia al huésped humano.

ES 2 319 758 T3

Se prefiere obtener una molécula de FVIII en la que la modificación del aminoácido (por ejemplo, una sustitución) se realice dentro de las regiones más inmunogénicas de la molécula original. Para la eliminación de epítomos de células T, las sustituciones de aminoácidos se realizan de preferencia en puntos apropiados dentro de la secuencia peptídica representada para conseguir la reducción sustancial o la eliminación de la actividad del epítomo de células T. En la práctica, un punto apropiado será de preferencia igual a un residuo aminoácido que se une dentro de uno de los bolsillos del interior del surco de unión de MHC de clase II. Se prefiere alterar la unión en el interior del primer bolsillo de la hendidura en la denominada P1 o posición de anclaje P1 del péptido. La calidad de la interacción de unión entre el residuo de anclaje P1 del péptido y el primer bolsillo del surco de unión de MHC de clase II es reconocido como el determinante principal de la afinidad de unión completa para todo el péptido. Una sustitución apropiada en esta posición del péptido será para un residuo acomodado con menor facilidad dentro del bolsillo, por ejemplo, la sustitución por un residuo más hidrófilo. Los residuos aminoácidos en el péptido en posiciones iguales respecto a la unión dentro de otras regiones del bolsillo dentro de la hendidura de unión de MHC también se consideran y se incluyen en el ámbito de la presente invención.

Como resultará claro para un experto en la materia, múltiples conjuntos alternativos de sustituciones pueden conseguir el objetivo de eliminar epítomos no deseados. Sin embargo, las secuencias resultantes serán reconocidas como homólogos cercanos con las composiciones específicas publicadas aquí y por consiguiente se incluyen en el ámbito de la presente invención.

Se entiende que las sustituciones de aminoácidos individuales dentro de un epítomo de células T potenciales son la vía preferente para la eliminación del epítomo. Se pueden contemplar combinaciones de sustitución dentro de un epítomo particular y pueden resultar particularmente apropiadas, por ejemplo, cuando los epítomos definidos individualmente estén solapados unos con otros. Además, las sustituciones de aminoácidos, tanto individualmente dentro de un epítomo determinado o en combinación dentro de un solo epítomo, se pueden hacer en posiciones diferentes a los "residuos del bolsillo" respecto al surco de unión de MHC de clase II, pero en cualquier punto dentro de la secuencia peptídica. Las sustituciones se pueden hacer con referencia a una estructura homóloga o a un método estructural obtenido por procedimientos *in silico* conocidos en la técnica y se puede basar en características estructurales conocidas de la molécula según esta invención. Todas estas sustituciones se incluyen en el ámbito de la presente invención.

Las sustituciones de aminoácidos distintas de las realizadas dentro de los péptidos identificados más arriba se pueden contemplar de forma particular cuando se hacen en combinación con sustitución(es) realizadas dentro de un péptido de la lista. Por ejemplo, se puede contemplar un cambio para restablecer la estructura o la actividad biológica de la molécula variante. Dichos cambios compensatorios y los cambios para incluir la delección o la adición de residuos aminoácido particulares a partir del polipéptido FVIII tienen como resultado una variante con la actividad deseada y en combinación con cambios en cualquiera de los péptidos publicados, se incluyen en el ámbito de la presente invención.

Puesto que esta invención se refiere a FVIII modificado, las composiciones que contienen dichas proteínas FVIII modificadas o fragmentos de proteínas FVIII modificadas y las composiciones relacionadas se deben considerar dentro del ámbito de la invención. Un ejemplo pertinente a este respecto podría ser el desarrollo de estrategias de inducción de tolerancia mediadas por péptidos donde uno o varios de los péptidos se administra a un paciente con fines inmunoterapéuticos. Por consiguiente, las moléculas de péptidos sintéticos, por ejemplo, una o varias de las enumeradas en la Tabla 1, se consideran realizaciones de la invención. En otro aspecto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican entidades FVIII modificadas. En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento terapéutico de humanos usando las proteínas FVIII modificadas. En otro aspecto más, la invención se refiere a métodos para el tratamiento terapéutico usando preparaciones farmacéuticas que comprenden péptidos o moléculas derivadas con secuencias o partes idénticas a las secuencias aquí descritas.

Ahora, la invención se ilustrará con los ejemplos siguientes, pero sin limitarse a ellos. El texto anterior y los ejemplos de abajo se refieren a las figuras siguientes:

En la Figura 1 se presenta una lista de secuencias peptídicas en el Factor VIII humano con potencial actividad de unión a MHC de clase II humanas. Los péptidos son 13meros, los aminoácidos se identifican usando el código de letras individuales.

La Figura 2 representa el esquema de cribado de mezclas de péptidos. En el presente estudio los péptidos fueron 15meros y cada péptido sucesivo se superponía en 12 residuos.

En la Figura 3 se presentan histogramas que representan los resultados de los ensayos de proliferación de células T *in vitro* en respuesta al tratamiento con péptidos sintéticos derivados de FVIII. En este ejemplo, una línea de células T de FVIII aislada de un donante hemofílico se usó para cribar mezclas de péptidos superpuestos abarcando la secuencia de FVIII. Las flechas indican mezclas que inducen la proliferación de células T y que posteriormente fueron decodificadas.

En la Figura 4 se presentan histogramas que representan los resultados de los ensayos de proliferación de células T *in vitro* en respuesta al tratamiento con péptidos sintéticos derivados de FVIII. En este ejemplo, una línea de células T específica para FVIII aislada de un donante hemofílico se usó para decodificar dos mezclas peptídicas que inducen la proliferación de células T. Los péptidos que contienen epítomos de células T se indican con una flecha.

ES 2 319 758 T3

En la Figura 5 se presentan histogramas que representan los resultados de los ensayos de proliferación de células T *in vitro* en respuesta a tratamientos con péptidos sintéticos derivados de FVIII. En este ejemplo, se usaron células de dos donantes para cribar los péptidos que abarcan la secuencia de FVIII. Tanto el donante n° 1 (A) como el donante n° 2 (B) tenían alotipos HLA-DR idénticos (DRB1*03, DRB1*04, DR3 y DR4*01). Las flechas indican los péptidos que contienen epítotos de células T.

En la Figura 6 aparece un gráfico que muestra los datos de actividad y niveles de expresión de proteínas para mutantes del péptido 8 (P8): el control positivo es el factor VIII wt. M1013K representa los datos de expresión y actividad para una molécula de FVIII que contiene la sustitución M1013K. Las columnas restantes son moléculas FVIII que combinan la sustitución M1013K con cambios adicionales en I1011 para el aminoácido indicado.

En la Figura 7 se presenta un gráfico que muestra los datos de actividad y niveles de expresión de proteínas para mutantes del péptido 7 (P7): el control positivo es el factor VIII wt, el control negativo es la ausencia de ADN en transfección. Las muestras restantes son mutantes V823 con el cambio de aminoácido indicado.

En la Figura 8 aparecen, a modo de ejemplo, los datos del ensayo de células T que muestran péptidos mutantes con un índice de estimulación de < 2,0 bajo condiciones en las que la secuencia peptídica wt muestra un índice de estimulación > 2,0. Están tabuladas las secuencias peptídicas y los datos de alotipo del donante de PBMC.

La Figura 9 muestra una representación de los resultados conseguidos usando el software de simulación de la unión de péptidos a MHC de clase II. Se muestran los resultados para 18 alotipos HLA-DR diferentes, cada columna vertical indica la unión de un alotipo individual. El panel A muestra el perfil de unión detectado para la secuencia de FVIII wt alrededor del péptido 7. La secuencia peptídica 7 aparece subrayada. El panel B muestra el perfil de unión detectado para una secuencia peptídica 7 modificada, conteniendo la sustitución V₈₂₃A y demuestra la pérdida de un ligando de alta afinidad para alotipos múltiples. En cada panel la unión a MHC predicha se representa señalando el primer residuo de cada ligando 13mero de MHC de clase II. La intensidad de la unión se señala como H, M o L en función del valor de unión calculado para cada ligando para cada alotipo, según se indica. Los estudios de enlace físico han indicado previamente que valores < 500.000 constituyen interacciones de unión insignificantes.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos y la numeración para una secuencia de FVIII humano salvaje (WT) sin dominio B. Los aminoácidos se representa usando códigos de una sola letra.

Ejemplo 1

Método para el establecimiento de líneas y clones de células T

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés peripheral blood mononuclear cells) a partir de sangre obtenida de pacientes hemofílicos y se almacenó criogénicamente en nitrógeno líquido.

Las muestras de sangre fueron aportadas con pleno consentimiento y se procesaron bajo la aprobación ética local de Addenbrooke's Health Care Trust.

Se establecieron líneas de células T por estimulación de células T específicas de antígeno en cultivos a granel usando FVIII seguido de varios ciclos de expansión inducida por IL-2. Inicialmente se incubaron las PBMC (a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%) a 2x10⁶ en 2 ml de medio AIM V conteniendo 4 ug/ml de FVIII (Refacto™) en placas de 24 pocillos. Tras 7 días de incubación se añadieron 100 U/ml de IL-2 y los cultivos se incubaron otros 3 días. Se recogieron los blastos T y se contaron hasta completar la estimulación antígeno/IL-2 de 10 días. Para retener la especificidad de antígeno, los blastos T se sometieron a una segunda ronda de estimulación antigénica usando PBMC autólogas γ -irradiadas como células presentadoras de antígeno. Esto se consiguió mediante la incubación de 1x10⁶ PBMC autólogas/pocillo en una placa de 24 pocillos con 4 μ g/ml de FVIII durante 1 hora en 0,75 ml de AIM V (conteniendo suero AB humano inactivado por calor al 5%) antes de someterse a irradiación μ de 4000 rads. Los blastos T autólogos en 0,25 ml de AIM V a 4x10⁵ células/ml se añadieron a las células presentadoras de antígeno γ -irradiadas (precargadas con FVIII) y se incubaron durante 3 días. Los blastos T se expandieron mediante estimulación celular con 100 U/ml de IL-2 durante 3 días; a los cultivos se les añadió IL-2 fresca (concentración final de 100 U/ml) a intervalos de 3 días durante un total de 9 días. Para garantizar que todos los blastos T expandidos eran específicos de antígeno se realizó una tercera ronda de estimulación de antígeno, en la que los blastos T se recogieron y se resuspendieron a 4x10⁵ células/ml en medio AIM V. Como se ha descrito antes, las células presentadoras de antígeno se generaron por incubación de 1x10⁶ PBMC autólogas γ -irradiadas en una placa de 24 pocillos con 4 ug/ml de FVIII durante 1 hora en 0,75 ml de AIM V (conteniendo suero AB humano inactivado por calor al 5%). Los blastos T autólogos en 0,25 ml de AIM V a 4x10⁵ células/ml se añadieron a las células presentadoras de antígeno γ -irradiadas incubadas durante 3 días. Se realizó una expansión final en 10 U/ml de IL-2, 3 días antes de recoger los blastos T y usarlos para cribar mezclas de péptidos.

Clonaje a partir de cultivos a granel

Tras la tercera estimulación con antígeno FVIII se recogieron los blastos T y se resuspendieron mediante dilución en serie hasta una densidad de 4x10² - 1x10⁴ células/ml (2 x densidad final del cultivo). Las PBMC autólogas se descongelaron y se volvieron a suspender a 2x10⁶ células/ml (2 x densidad final del cultivo) en un tubo de polipropi-

ES 2 319 758 T3

leno. Las PBMC se expusieron a 4000 rads de γ -irradiación y se usaron como células presentadoras de antígeno para seleccionar clones de células T reactivos a antígeno por dilución limitante. Las células presentadoras de antígeno γ -irradiadas (densidad final 1×10^6) se mezclaron con los blastos T (densidad final $2 \times 10^2 - 5 \times 10^3$), 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno FVIII y 100 U/ml de IL-2. Los clones de células T se establecieron en placas Terasaki añadiendo a cada pocillo 20 μl de la mezcla APC, blasto T, FVIII e IL-2. Se realizó el clonaje por dilución limitante usando 2-50 blastos T/pocillo de una placa Terasaki.

Selección y mantenimiento de clones de células T

Los blastos T se incubaron con antígeno FVIII, IL-2 y células autólogas presentadoras de antígeno γ -irradiadas durante aproximadamente 14 días. Tras identificar los pocillos que contenían células que mostraban crecimiento inequívoco, los blastos T se transfirieron a un solo pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo conteniendo 1×10^5 PBMC alogénicas γ -irradiadas, 100 U/ml de IL-2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA) en un volumen final de 200 μl de AIM V (con suero AB humano inactivado por calor al 1%). Los clones de células T se rompieron cuando las células se volvieron confluentes y finalmente se transfirieron a un solo pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo 1×10^6 PBMC alogénicas γ -irradiadas (células cebadoras), 100 U/ml de IL-2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA) en un volumen final de 2 ml de AIM V (con suero AB humano inactivado por calor al 1%). El mantenimiento de rutina de los clones de células T incluyó estimulación con PHA fresca y células cebadoras alogénicas cada 2-3 semanas (dependiendo del crecimiento celular) y la estimulación dos veces por semana con 100 U/ml de IL-2. Únicamente los clones de células T que demostraron ser específicos de FVIII se expandieron y se usaron para cribar péptidos FVIII.

Transformación EBV de células B autólogas

Las células B de preparaciones de PBMC fueron immortalizadas para generar líneas celulares de linfoblastoide B (BLCL) añadiendo 3 ml de sobrenadante B95.8 filtrado (0,45 μl) a 4×10^6 PBMC e incubando a 37°C durante 1 hora. Las PBMC se precipitaron y se volvieron a suspender en 2 ml de RPMI conteniendo suero bovino fetal (FCS) inactivo por calor al 5% y 1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A. Tras 7 días de incubación se reemplazó 1 ml de cultivo con RPMI fresco conteniendo FCS 5% y 2 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A (para dar una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A). Este régimen de alimentación se repitió los días 14 y 21, tras lo que las células se rompieron, de ser necesario usando RPMI con FCS 5% y se expandieron en frascos de cultivo celular.

Cribado de péptidos FVIII usando líneas/clones de células T

Se sintetizaron péptidos de 15 residuos de longitud y superpuestos con los péptidos previos en incrementos de 12 aminoácidos (Pepscan, Países Bajos). Inicialmente los péptidos se solubilizaron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) 100% para ser almacenados. Se generaron mezclas de péptidos para cribar simultáneamente un gran número de péptidos frente a líneas de células T específicas de FVIII. Las mezclas se organizaron de manera que cada mezcla contenía péptidos superpuestos de las mezclas siguientes; mediante el uso de este enfoque los epítomos de células T que superponían dos péptidos inducirían la proliferación de dos mezclas separadas. Cada mezcla consistía típicamente en 8 péptidos, analizándose cada péptido tanto a 1 como a 5 μM . La estrategia de las mezclas de péptidos se ilustra en la Figura 2.

Se usaron PBMC autólogas (para líneas de células T) o BLCL transformadas con EBV (para clones de células T) como células presentadoras de antígeno mediante resuspensión de 1×10^5 PBMC o BLCL en 50 μl de medio AIM V que después se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las mezclas de péptidos se añadieron en pocillos por triplicado para cada mezcla a ambas concentraciones (1 o 5 μM). Las células presentadoras de antígeno y las mezclas de péptidos se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de la exposición a 4000 rads de γ -irradiación. Las BLCL se pretrataron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C durante 1 hora a 37°C seguido de lavado 4 veces en AIM V para el uso como células presentadoras de antígeno (en lugar de PBMC autólogas γ -irradiadas) para clones de células T. Después se añadieron líneas o clones de células T específicas de antígeno a 5×10^4 células por pocillo y los cultivos se incubaron durante 3 días. Al tercer día cada pocillo fue pulsado con 1 μCi de [^3H]-timidina durante un mínimo de 8 horas. Tras sembrar las placas en filtermats se determinaron las cpm/pocillo usando un contador Wallac Microplate Beta. En la Figura 3 se muestra un mapa de epítomos generado usando una línea de células T donde se usaron blastos T para identificar mezclas de péptidos que contenían epítomos de células T, decodificándose entonces estas mezclas para identificar el péptido individual que contenía el epítomo de células T.

Mapa de epítomos de células T nativas usando PBMC de donantes sanos

Se usó sangre de 40 donantes sanos de tipo HLA-DR para aislar PBMC que se usaron para cribar péptidos FVIII individuales a dos concentraciones (1 y 5 μM). Como el número de PBMC de cada donante fue insuficiente para cribar todos los péptidos FVIII, los donantes se separaron en dos grupos de modo que los primeros 20 donantes se usaron para cribar los péptidos expandiendo la primera mitad de la molécula y el segundo conjunto de donantes se usó para cribar los péptidos restantes. Los donantes se seleccionaron según los alotipos expresados de MHC de clase II para cubrir un gran número de alotipos presentes en la población mundial. Los alotipos de MHC se detectaron usando.

Se analizaron los tipos de tejido para todas las muestras de PBMC usando un sistema de reactivos disponible comercialmente (DynaL, Wirral, Reino Unido). Los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos recomendados por los proveedores y con reactivos auxiliares estándar y sistemas de electroforesis de agarosa.

ES 2 319 758 T3

Las PBMC contienen un número fisiológico de células T nativas y células presentadoras de antígeno. Estas células se usaron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo (placa de 96 de fondo plano) para cribar péptidos a 1 y 5 μM en cultivos de 200 μl por triplicado. Las células se incubaron con péptidos a 37°C durante 6 días, pulsando antes cada pocillo con 1 μCi de [^3H]-timidina durante un mínimo de 8 horas. Los cultivos se sembraron en filtermats y se determinaron las cpm/pocillo usando un contador Wallac Microplate Beta. La Figura 5 muestra un mapa de epítomos de FVIII generado usando dos donantes para cribar mitades separadas de la molécula.

Ejemplo 2

Método para el clonaje y la expresión del Factor VIII

Extracción de ARNm y síntesis de ADNc

Se obtuvo tejido hepático humano del departamento de patología de un hospital. La muestra se cortó en cubos de pequeño tamaño, se dispuso en alícuotas de 50 mg y se almacenó en nitrógeno líquido. Se homogeneizó una alícuota de 50 mg y se extrajo ARNm directamente, usando un kit PolyAtract System 1000 (Promega) según las instrucciones del fabricante, obteniéndose aprox. 10 μg de ARNm. Alícuotas de 1 μg de ARNm se transcribieron de forma reversa en reacciones de 20 μl usando el sistema de transcripción reversa ImProm-II (Promega) usando un cebador oligo(dT)₁₅ según las instrucciones del fabricante. Después se inactivó el enzima transcriptasa reversa calentando a 70°C durante 15 min.

Amplificación de secuencias de Factor VIII por reacción en cadena de la polimerasa

Al tener que clonar una variante del factor VIII sin dominio B, se amplificó ADNc a partir de ADNc en dos mitades. El extremo 5' del ARNm se amplificó usando los cebadores siguientes:

SEQ ID NO. 1 GCATCGCGCTAGCAATAAGTCATGCAAATAGAG

SEQ ID NO. 2 GAAGCTCCTAGGTTCAATGGCATTGTTTTACTCA

La SEQ ID No. 1 contiene dos sitios de enzimas de restricción para facilitar el clonaje, así como 24 nucleótidos de la secuencia de ARNm del factor VIII rodeando el cordón iniciador ATG (negrita). La SEQ ID No. 2 es complementaria a los nucleótidos 2420 a 2454 del ARNm del factor VIII y contiene dos nucleótidos cambiados en las posiciones 2445 y 2448 (mostradas en negrita) que introducen un nuevo sitio de enzima de restricción mientras la secuencia de proteína permanece inalterada.

El extremo 3' del gen del factor VIII se amplificó usando el siguiente par cebador:

SEQ ID NO. 3:

TGAGTCTTAAGCTAGCTAGATACCTAGGAGCTTCTCCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCC

SEQ ID NO. 4:

TACGTCTCGAGTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTCGCA

La SEQ ID No. 3 contiene el sitio para el enzima de restricción NheI para facilitar el clonaje, así como los nucleótidos 2442 a 2457 del ARNm del factor VIII fundidos a los nucleótidos 5140 a 5164. Por consiguiente, este cebador crea la unión entre las cadenas pesadas y ligeras donde casi todo el dominio B está ausente. Este cebador también contiene los cambios de nucleótidos en las posiciones 2445 y 2448 (mostradas en negrita) que crean el nuevo sitio para el enzima de restricción que también se encuentra en SEQ ID No. 2. La SEQ ID No. 4 contiene los 24 nucleótidos finales de la secuencia codificante del factor VIII más un sitio para enzima de restricción para facilitar el clonaje.

Las reacciones PCR se realizaron usando polimerasa Expand HiFi (Roche), usando el tampón proporcionado que contiene MgCl_2 en un volumen final de 50 μl . Las reacciones se enrasaron con tampón 1x conteniendo 200 μM de cada dNTP, 50 pmol de cada cebador (o bien SEQ ID No. 1 más No. 2 o SEQ ID No. 3 más No. 4), 2,5 unidades de RnasaH, y 5 μl de mezcla de reacción de transcriptasa reversa. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 min para que el ARN en el híbrido ARN/ADNc fuera degradado por la RnasaH para incrementar la eficacia de la reacción PCR. Después, las reacciones se calentaron a 94°C durante 2 min para la desnaturalización inicial, seguido de ciclación durante los tiempos y a las temperaturas siguientes: 94°C/30 seg., 55°C/30 seg., 72°C/2,5 min. Durante la primer etapa de formación de anillo se añadió la cantidad recomendada de polimerasa y la reacción se cicló 20 veces. Durante la etapa de formación de anillo siguiente a la 20ª etapa de extensión, se añadió una segunda alícuota de polimerasa y la reacción se cicló otras 20 veces. Después, la reacción se incubó a 72°C durante 10 min para asegurar la polimerización completa de todas las hebras.

ES 2 319 758 T3

Clonaje y ensamblaje del gen del factor VIII

Una mitad de las reacciones PCR se separó en un gel de agarosa 1% y la banda de 2286 bp correspondiente al extremo 5' del ADNc del factor VIII y la banda 2015 bp correspondiente al extremo 3' se cortaron y se purificaron de la agarosa mediante el kit Qiagen Gel Extract. Los productos de PCR se ligaron después en un vector de clonación del producto de PCR (pGEM-T Easy Vector System, Promega) como indica el fabricante. Se electroporó 1 μ l de cada reacción de ligación en 20 μ l de cepa *E. coli* electrocompetente XL1-Blue (Stratagene) como recomienda el proveedor, usando una cubeta de 0,1 cm de paso. Las células se resuspendieron y se dejaron recuperar, también según las recomendaciones del proveedor. Se dispusieron alícuotas de 10 μ l y 100 μ l de las células electroporadas en placas de agar LB que contenían 100 μ g/ml de ampicilina, 80 μ g/ml de Xgal e IPTG 0,5 mM y crecieron a 37°C durante la noche.

Se recogieron las colonias blancas se recogieron que dispersaron en 20 μ l de agua. Se analizó vía PCR una muestra de cada colonia resuspendida en un volumen de reacción de 20 μ l usando Taq polimerasa (Roche) con el tampón proporcionado. Las reacciones se enrasaron en tampón 1x conteniendo 200 μ M de cada dNTP, 60 pmol de cada cebador, siendo el estándar M13 los cebadores directo y reverso (aquí las SEQ ID No. 5 y 6), y 1 μ l de colonia resuspendida. Después se calentaron las reacciones a 94°C durante 2 min para realizar la desnaturalización inicial, seguido de ciclación x20 para las temperaturas y tiempos siguientes: 94°C 30 seg., 60°C 30 seg., 72°C 2 min. Después, la reacción se incubó a 72°C durante 10 min para asegurar la polimerización completa de todas las hebras.

Se separó una muestra de 5 μ l de cada reacción en un gel de agarosa 1%. Las muestras que contenían bandas a aproximadamente 2300 bp se consideraron positivas para la mitad 5' del inserto del factor VIII y aquellas que contenían bandas a aprox. 2150 bp se consideraron positivas para la mitad 3' del inserto del factor VIII. En cada inserto se inocularon cada una de las 8 colonias en cultivos de 5 ml de caldo 2YT/100 μ g/ml de ampicilina y crecieron durante la noche a 37°C con agitación. El plásmido se preparó a partir de 1,5 ml de cada cultivo usando un kit mini-prep Qiagen y los plásmidos se enviaron a un dispositivo de secuenciación de contracción para determinar la secuencia con los cebadores siguientes:

Clones mitad 5':

SEQ ID No. 5	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	(M13 directa)
SEQ ID No. 6	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	(M13 reversa)
SEQ ID No. 7	ATGATCAGACCAGTCAAAGG	(ARNm de factor VIII nt573-592)
SEQ ID No. 8	CAGGAAATCAGTCTATTGGC	(ARNm de factor VIII nt975-994)
SEQ ID No. 9	TGGGTACATTACATTGCTGC	(ARNm de factor VIII nt1372-1391)
SEQ ID No. 10	ACAGTGA CTGTAGAAGATGG	(ARNm de factor VIII nt1768-1787)
SEQ ID No. 11	GTCTTCTTCTCTGGATATACC	(ARNm de factor VIII nt2179-2199)

Clones mitad 3':

SEQ ID No. 5	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	(M13 directa)
SEQ ID No. 6	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	(M13 reversa)
SEQ ID No. 12	GAGTAGCTCCCCACATGTTC	(ARNm de factor VIII nt5370-5361)
SEQ ID No. 13	GTGCACTCAGGCCTGATTGG	(ARNm de factor VIII nt5786-5767)
SEQ ID No. 14	AGGTGTTTTTGGAGACAGTGG	(ARNm de factor VIII nt6187-6168)
SEQ ID No. 15	GAGGAAATCCACTGGAACC	(ARNm de factor VIII nt6594-6575)
SEQ ID No. 16	AATCTCTGCTTACCAGCATG	(ARNm de factor VIII nt6993-6974)

Se observó que el plásmido pCF85 codificaba la secuencia de aminoácidos correcta para la mitad 5' del gen del factor VIII. Se encontró que el plásmido pCF83 codificaba la secuencia de aminoácidos correcta para la mitad 3' del gen del factor VIII.

Se digirió pCF83 con Bst98I y XhoI y el fragmento de 2,0 Kbp liberado que contenía la mitad 3' del gen del factor VIII se purificó mediante electroforesis de gel de agarosa y se clonó en pLitmus (NEB) cortado y purificado de forma similar, usando técnicas estándar. Las colonias bacterianas positivas se identificaron mediante PCR como se describe arriba y se seleccionó un clon, pCLF83, que creció y se elaboró ADN.

ES 2 319 758 T3

Se digirió pCF85 con BssHIII y los extremos se hicieron romos con ADN polimerasa T4 (NEB) en presencia de 100 μM de cada dNTP. A continuación se calentó la reacción a 70°C durante 10 min y se digirió con AvrII. El fragmento de 2,3 kbp liberado se purificó mediante electroforesis de gel de agarosa y se clonó en pCLF83 que se había digerido con Bst98I, su extremos se hicieron romos como se indica más arriba, se digirió con AvrII y se purificó en gel. Las colonias bacterianas positivas se identificaron mediante cribado por PCR como se describe más arriba, usando cebadores SEQ ID No. 11 y SEQ ID No. 17 (ATCAGTAAATTCCTGGAAAAC [ARNm factor VIII nt5448-5428]). Estos cebadores amplifican un fragmento a través de la unión entre las dos mitades del gen del factor VIII y, por tanto, sólo se ve un producto de aprox. 570 bp si el clonaje ha tenido éxito. Se seleccionó una colonia positiva y se denominó pCLF8. Se hizo crecer esta colonia y se preparó y secuenció ADN. Las secuencias de unión correctas se confirmaron usando cebadores SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 5. Se verificó la unión entre las mitades 5' y 3' igualmente con el cebador SEQ ID No. 17.

Análisis de la expresión y la actividad del factor VIII

La proteína FVIII se expresó usando una variante modificada del vector pCI (Promega, Southampton, Reino Unido). El vector pCI no modificado tiene una longitud de 4,0 kbp y contiene un potenciador/promotor CMV y una señal de poliadenilación tardía SV40 para la expresión en mamíferos y contiene las secuencias necesarias para la propagación bacteriana. El vector también contiene un origen bacteriófago F1 y éste se eliminó al digerir el plásmido con enzimas de restricción BamHI y EcoO109I. Se cegaron los extremos de los productos digeridos usando ADN polimerasa T4 como se describe más arriba, y a continuación se separaron con gel de agarosa 1%. El fragmento vector de 3,2 kbp se purificó del gel, se autoligó y se transformó en la cepa XL1-blue bacteriana como se describe más arriba. Las colonias se recogieron, se hicieron crecer durante la noche y los plásmidos se sometieron a una minipreparación como se describe más arriba. Las muestras de los plásmidos purificados se digirieron con enzima de restricción NgoMIV, el cuál está presente en la secuencia de origen F1, y se analizaron vía electroforesis de gel de agarosa. Se seleccionó un plásmido resistente y se denominó pCIA.

Se digirió pCIA con los enzimas de restricción NheI y XhoI y el fragmento de vector se purificó mediante electroforesis de gel de agarosa. Se digirió de forma similar pCLF8 y el fragmento de 4,4 kbp que contenía el gen del factor VIII se purificó mediante electroforesis de gel de agarosa y se clonó en el corte pCIA usando técnicas estándar. Las colonias bacterianas positivas se identificaron mediante análisis de PCR usando los cebadores SEQ ID No. 11 y SEQ ID No. 17, como se describe más arriba.

Se seleccionó una colonia positiva, denominada pCIF8 y se inoculó en 50 ml de caldo 2YT que contenía 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina, que creció durante la noche a 37°C con agitación vigorosa. El plásmido de ADN de alta pureza se preparó usando un kit midi-prep Qiagen. El plásmido de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría, se diluyó a 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se filtró de forma estéril a través de una unidad de filtro de 1,5 cm de diámetro y 0,2 μm de poro (Nalgene).

Se mantuvieron células HEK 293 (ATCC CRL-1573) en cultivo continuo en frascos de cultivo de tejido de 75 cm^2 en DMEM que contenían Glutamax-I, piruvato sódico y 4500 mg/ml de glucosa (Invitrogen n° cat 31966-021), complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Perbio n° cat CH30160.03). Las células crecieron a 37°C/CO₂ 5% y se subcultivaron por dilución 1/5 cada 48 h. Las células HEK 293 se adhieren sólo débilmente al plástico del cultivo de tejido y se pueden separar lavando la superficie del frasco.

Las células HEK293 se transfectaron en placas de cultivo de tejido recubiertas con poli-L-lisina de 24 pocillos (Beckton Dickinson) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como indica el fabricante. Las células casi confluentes se lavaron en un frasco de cultivo de tejido de 75 cm^2 con tampón fosfato salino (PBS) y se separaron del frasco de cultivo de tejido usando una solución de tripsina/EDTA. La tripsina se inactivó por adición de un volumen igual de medio de crecimiento. Las células se contaron en un hemocitómetro y la suspensión de células se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet de células se resuspendió en medio de crecimiento a una densidad de 4×10^5 células/ml. Se dispersaron 0,5 ml de la suspensión de células en cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos y se incubó durante la noche a 37°C/CO₂ 5%. Antes de la transfección se eliminó el medio de cada pocillo y se substituyó por 0,5 ml de medio fresco. Se diluyeron 0,8 μg del plásmido pCIF8 y el plásmido control negativo pCIA a 50 μl cada uno en Optimem (Invitrogen n° cat 51985-026). Para cada transfección, se diluyeron 2 μl de Lipofectamina 2000 a 50 μl , se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y después se combinaron con plásmido diluido seguido de otra incubación a temperatura ambiente durante 20 min. Las transfecciones se realizaron por triplicado y se añadieron 100 μl de cada mezcla de plásmido y lípido gota a gota a un pocillo de la placa de 24 pocillos. Después se incubaron las placas a 37°C/CO₂ 5%. Se retiraron alícuotas de 10 μl de cada transfección a las 24 h, 48 h y 72 h. Se combinaron alícuotas de cada triplicado para dar un volumen total de 30 μl por muestra y se congelaron a -80°C antes del análisis de actividad.

Se analizó la actividad del factor VIII en el sobrenadante usando un kit Coatest F8:C/4 (Chromogenix) en formato microtítulo según las instrucciones del fabricante. Las muestras del sobrenadante se descongelaron en hielo, se diluyeron a 1/20 y 1/100 en tampón de ensayo y se analizaron por duplicado. Los estándares fueron muestras de plasma liofilizadas cuantificadas por medio de estándares internacionales para la actividad del factor VIII (Chromogenix). Un vial de plasma se reconstituyó en 1 ml de agua, como indica el fabricante. En la hoja de datos adjunta se consultó el nivel de actividad del factor VIII en el plasma, que se diluyó entonces al 100% (1IU/ml) por adición de tampón de ensayo. Después, los estándares se diluyeron como se describe en el protocolo de análisis de microtítulo del fabricante. Tras 24 horas, se encontró que los sobrenadantes de las células transfectadas con pCIF8 contenían actividad 0,16

ES 2 319 758 T3

IU/ml, que aumentaba a 0,74 IU/ml a las 48 horas y después caía a 0,5 IU/ml a las 72 horas. No se observó actividad en los sobrenadantes de células transfectadas con vector control. Por consiguiente, el factor VIII se expresó con éxito en cantidades suficientes para determinar la actividad de los mutantes.

5 Mutagénesis de aminoácidos en el péptido P10 (Tabla 2)

El péptido 10 contiene cuatro residuos hidrófobos con el potencial de ser el anclaje primario para la interacción con moléculas MHC de clase II, F1207, I1208, I1209 y M1210 (numeración según la secuencia madura sin dominio B). Por consiguiente, estos cuatro residuos fueron las dianas para la mutación a residuos distintos de los que potencialmente pueden ser anclajes primarios. F1207 se cambió a: A, H, K, N, Q y R; I1208 se cambió a: A, T, D, N; I1209 se cambió a: A, C, D, N, P; M1210 se cambió a: A, K, N y Q. La mutagénesis se realizó mediante overlap-PCR usando protocolos establecidos conocidos por los expertos en la materia. El péptido 10 se encuentra dentro de un fragmento de la secuencia de nucleótidos del factor VIII unida por los sitios de restricción PspOMI y SphI. Los cebadores del PCR para la amplificación de este fragmento se sintetizaron correspondientemente para secuencias justo fuera de esta región (SEQ ID No. 18 y No. 19, abajo). Para la mutagénesis de F1207, se sintetizaron cebadores internos como los descritos a continuación:

20	SEQ ID No.18:	GGACACATTAGAGATTTTCA	(gen nt.3463-3482)
	SEQ ID No.19:	CAGTAATCTGTGCATCTGAT	(gen nt.3949-3930)
	SEQ ID No.20:	CTGAGAGATGTAGAGGCT	(gen nt.3675-3658)
25	SEQ ID No.21:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{gcc} ATCATCATGT	(F1207A)
	SEQ ID No.22:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{cac} ATCATCATGT	(F1207H)
	SEQ ID No.23:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{aag} ATCATCATGT	(F1207K)
	SEQ ID No.24:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{aac} ATCATCATGT	(F1207N)
30	SEQ ID No.25:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{cag} ATCATCATGT	(F1207Q)
	SEQ ID No.26:	AGCCTCTACATCTCTCAG ^{gac} ATCATCATGT	(F1207R)

35 Los PCR se realizaron usando Expand HiFi polimerasa (Roche), usando el tampón proporcionado que contenía MgCl₂ en un volumen final de 50 µl. La reacción del fragmento 5' contenía tampón 1x que a su vez contenía 200 µM de cada dNTP, 50 pmol de cada cebador (SEQ ID No. 18 más No. 20), 100 ng de pCIF8 y 2,5 unidades de Expand polimerasa. Se iniciaron seis reacciones de fragmentos 3' que contenían tampón 1x que contenía a su vez 200 µM de cada dNTP, 50pmol de cada cebador (SEQ ID No. 19 más SEQ ID No. 21, 22, 23, 24, 25 o 26), 100 ng de pCIF8 y 2,5 unidades de Expand polimerasa. Después, las reacciones se incubaron a 94°C durante 2 min para la desnaturalización inicial, seguido de ciclación durante los tiempos y temperaturas siguientes: 94°C/30 seg., 50°C/30 seg., 72°C/30 seg. Las reacciones se ciclaron 20 veces y después se incubaron a 72°C durante 10 min para asegurar la polimerización completa de todas las hebras.

45 Se separó una mitad de cada PCR en un gel de agarosa 1% y el fragmento 5' de 226 bp y los seis fragmentos 3' diferentes de 292 bp se cortaron del gel y se purificaron usando un kit Qiagen Gel Extract. El fragmento 5' se unió entonces a cada uno de los fragmentos 3', como sigue: se realizaron otros seis PCR como se describe más arriba usando Expand HiFi polimerasa, usando como molde 2 µl de fragmento 5' eluído con 2 µl de cada uno de los seis fragmentos 3' eluídos, con los cebadores SEQ ID No. 18 y SEQ ID No. 19. Se separó la mitad de estas reacciones en un gel de agarosa 1% y las seis bandas de 486 bp se purificaron como se describe más arriba. Cada producto de PCR se digirió con enzimas de restricción PspOMI y SphI en un volumen de reacción total de 50 µl a 37°C durante la noche. Se digirieron de forma similar 4 µl de plásmido pCIF8 durante 2 h a 37°C y la mitad de las digestiones del plásmido y los fragmentos de PCR de 391 bp se cortaron a partir del gel y se purificaron como se indica más arriba en volúmenes finales de 30 µl cada uno en agua. Se ligó 1 µl de vector a 3 µl de cada uno de los seis fragmentos en reacciones estándar de ligación de 10 µl usando ADN ligasa T4 y el tampón proporcionado (Invitrogen). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h. Se electroporó 1 µl de cada reacción de ligación en 20 µl de cepa *E. coli* electrocompetente XL1-Blue (Stratagene) como recomienda el proveedor, usando una cubeta de 0,1 cm de paso. Las células se resuspendieron y se dejaron recuperar siguiendo igualmente las recomendaciones del proveedor. Se dispusieron alícuotas de 10 µl y 100 µl de las células electroporadas en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina, las cuales crecieron a 37°C durante la noche.

65 Se recogieron cuatro colonias de cada ligación en placa y se hicieron crecer durante la noche en 5 ml de líquido de cultivo en caldo 2YT más 100 µg/ml de ampicilina a 37°C con agitación vigorosa. El plásmido de ADN se preparó a partir de 1,5 ml de cada cultivo usando un kit Qiagen Mini-Prep. Se secuenció el ADN de las muestras de cada plásmido usando el cebador SEQ ID No. 18. Un plásmido de cada grupo de cuatro con la secuencia correcta se seleccionó y almacenó para analizar vía transfección los niveles de expresión y actividad.

ES 2 319 758 T3

Este mismo procedimiento general se siguió para crear las mutaciones en I1208, I1209 y M1210. Los cebadores usados para cada aminoácido fueron los siguientes:

5	<u>I1208:</u>		
	SEQ ID No.18:	GGACACATTAGAGATTTTCA	(gen nt.3463-3482)
	SEQ ID No.19:	CAGTAATCTGTGCATCTGAT	(gen nt.3949-3930)
10	SEQ ID No.20:	CTGAGAGATGTAGAGGCT	(gen nt.3675-3658)
	SEQ ID No.27:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTgccATCATGT	(I1208A)
	SEQ ID No.28:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTaccATCATGT	(I1208T)
15	SEQ ID No.29:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTgacATCATGT	(I1208D)
	SEQ ID No.30:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTaacATCATGT	(I1208N)
20	<u>I1209:</u>		
	SEQ ID No.18:	GGACACATTAGAGATTTTCA	(gen nt.3463-3482)
	SEQ ID No.19:	CAGTAATCTGTGCATCTGAT	(gen nt.3949-3930)
25	SEQ ID No.20:	CTGAGAGATGTAGAGGCT	(gen nt.3675-3658)
	SEQ ID No.31:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCgccATGTATA	(I1209A)
	SEQ ID No.32:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCtgcATGTATA	(I1209C)
30	SEQ ID No.33:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCgacATGTATA	(I1209D)
	SEQ ID No.34:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCaacATGTATA	(I1209N)
35	SEQ ID No.35:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCcccATGTATA	(I1209P)
40	<u>M1210:</u>		
	SEQ ID No.18:	GGACACATTAGAGATTTTCA	(gen nt.3463-3482)
	SEQ ID No.19:	CAGTAATCTGTGCATCTGAT	(gen nt.3949-3930)
	SEQ ID No.20:	CTGAGAGATGTAGAGGCT	(gen nt.3675-3658)
45	SEQ ID No.36:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCgccTATAGTC	(M1210A)
	SEQ ID No.37:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCaagTATAGTC	(M1210K)
	SEQ ID No.38:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCaacTATAGTC	(M1210N)
50	SEQ ID No.39:	AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCcagTATAGTC	(M1210Q)

Se transfectaron clones para cada mutación, que habían sido verificados mediante análisis de la secuencia, en células HEK 293 en placas poli-L-lisina de 24 pocillos por duplicado, como se describe más arriba. Las transfecciones se incubaron durante 48 h a 37°C/CO₂ 5%. Se mezclaron los sobrenadantes por duplicado para cada transfección y se analizó la actividad del factor VIII, como se describe más arriba. En los sobrenadantes también se analizaron los niveles de expresión del factor VIII usando un kit ELISA de anticuerpos anti-factor VIII apareados (Affinity Biologicals). Este ensayo se modificó para cuantificar de forma eficaz material sobrenadante de cultivos de tejido y se realizó de la siguiente forma: el anticuerpo de captura se diluyó 1/100 en tampón carbonato/bicarbonato sódico pH 9,6 y se añadieron 100 µl por pocillo a una placa ELISA Dynex Immulon 4 de 96 pocillos. La placa se incubó durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron x4 con 100 µl cada uno de tampón de lavado (suero salino tamponado Tris [TBS: Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM, pH 7,4 @ 25°C] conteniendo Tween 20 0,1%) y se añadieron por duplicado alícuotas de 100 µl de estándar diluido y sobrenadantes de cultivo de tejido por pocillo. Los estándares fueron muestras de plasma liofilizadas cuantificadas que corresponden a estándares internacionales para la actividad del factor VIII (Chromogenix). Un vial de plasma se reconstituyó en 1 ml de agua, como indica el fabricante. En la hoja de datos adjunta se consultó el nivel de actividad del factor VIII en el plasma, que se diluyó entonces al 100% (1 IU/ml) por adición de tampón de dilución de muestra (TBS conteniendo albúmina de suero bovino al 1% p/v). El

ES 2 319 758 T3

resultado se diluyó después 1 a 4 con el tampón de dilución de muestra para dar el estándar ELISA del 100%. Después, este se siguió diluyendo con tampón de dilución de muestra para dar los estándares que representan el 75%, 50%, 25% y 5%. Los sobrenadantes del cultivo de tejido se diluyeron 1 a 4 con tampón de dilución de muestra. La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó x4 con tampón de lavado, 100 µl por pocillo. Se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano picante y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó como antes y se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato (solución ya preparada de TMB/peróxido: Sigma nº cat T0440). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min seguido de adición de solución de parada (ácido sulfúrico 2M). La placa se leyó en un lector de placas Anthos HTII usando un filtro de 450 nm.

La comparación de los valores de actividad y los niveles de expresión revela que todos los cambios en F1207 dan como resultado la ausencia de expresión y por tanto de actividad. La mutación de I1208 a A da como resultado una expresión y actividad similar al factor VIII no modificado, mientras que los cambios a T y N dan como resultado pérdidas del 25% y 50% en la actividad. En el caso de I1209, sólo la mutación a C permitió la expresión y la actividad de esta variante fue similar al factor VIII no modificado. Todos los cambios en M1210 dan como resultado la expresión de proteínas con actividad apreciable con K y N, siendo indistinguibles del factor VIII no modificado. Por consiguiente, I1208A, I1209C, M1210K y M1210N son mutaciones útiles para eliminar el epítipo de células T dentro del péptido 10.

Mutagénesis de aminoácidos en el péptido P8 (Tabla 2)

El péptido 8 contiene dos aminoácidos que son anclajes primarios potenciales para la interacción con moléculas MHC de clase II, I1011 y M1013 (numeración según la secuencia madura sin dominio B). Por consiguiente, estos dos residuos fueron las dianas para la mutación a residuos distintos de los que potencialmente pueden ser anclajes primarios. La comparación con las secuencias del factor VIII de otras especies (perro, ratón y rata) reveló que M1013 es K en el factor VIII del perro. K también demostró ser la mejor sustitución para M1210 para la mutagénesis del péptido 10. Por consiguiente, M1013 se mutó sólo a K y en combinación con todos los aminoácidos en I1011 que no tienen el potencial de formar anclajes primarios (es decir, A, C, D, E, K, N, P, Q, R, S, T).

La mutagénesis se realizó mediante overlap-PCR usando protocolos establecidos conocidos por los expertos en la materia. El péptido 8 se encuentra dentro de un fragmento de 490 bp de la secuencia de nucleótidos del factor VIII, unido por los sitios de restricción PflMI1 y PspOMI. Los cebadores de PCR para la amplificación de este fragmento se sintetizaron correspondientemente para secuencias justo fuera de esta región (SEQ ID No. 40 y No. 41, abajo). Para la mutagénesis de M1013K más I1011X, se sintetizaron cebadores internos que se utilizaron usaron como se describe a continuación:

SEQ ID No.40:	ATGAGACCAAAAGCTGGT	(gen nt.3026-3043)
SEQ ID No.41:	AGGCATTGATTGATCCG	(gen nt.3559-3543)
SEQ ID No.42:	ATTGCAGGGAGCCCTGCAGT	(gen nt.3087-3068)
SEQ ID No.43:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGaagGAAGA	(M1013K)
SEQ ID No.44:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgccCAGaagGAAGA	(I1011A, M1013K)
SEQ ID No.45 :	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATtgcCAGaagGAAGA	(I1011C, M1013K)
SEQ ID No.46:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgacCAGaagGAAGA	(I1011D, M1013K)
SEQ ID No.47:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgagCAGaagGAAGA	(I1011E, M1013K)
SEQ ID No.48:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATggcCAGaagGAAGA	(I1011G, M1013K)
SEQ ID No.49:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcacCAGaagGAAGA	(I1011H, M1013K)
SEQ ID No.50:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaagCAGaagGAAGA	(I1011K, M1013K)
SEQ ID No.51:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaacCAGaagGAAGA	(I1011N, M1013K)
SEQ ID No.52:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcccCAGaagGAAGA	(I1011P, M1013K)
SEQ ID No.53:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcagCAGaagGAAGA	(I1011Q, M1013K)
SEQ ID No.54:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcgcCAGaagGAAGA	(I1011R, M1013K)
SEQ ID No.55:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATagcCAGaagGAAGA	(I1011S, M1013K)
SEQ ID No.56:	ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaccCAGaagGAAGA	(I1011T, M1013K)

ES 2 319 758 T3

La mutagénesis se realizó usando el mismo procedimiento general descrito más arriba para la mutagénesis del péptido 10, excepto que el fragmento 5' tenía una longitud de 62 bp y el fragmento 3' una longitud de 492pb. El fragmento unido tenía una longitud de 534 bp y se digirió con PspOMI y PflM1 y se clonó en pCIF8 digerido de forma similar.

5

Se seleccionó un clon con la secuencia correcta para cada mutante y se analizaron sus niveles de actividad y expresión como se describe más arriba, excepto que las transfecciones se hicieron por triplicado y cada sobrenadante se analizó de forma individual de manera que se pudieran evaluar las variaciones en la expresión/actividad.

10

La comparación de los niveles de expresión y la actividad de los mutantes descrita más arriba reveló que sólo M1013K era muy similar al factor VIII no modificado. Además, la combinación de mutantes que contienen M1013K más I1011A, B, P, S o T también fueron indistinguibles del factor VIII no modificado. Por consiguiente, estas mutaciones son útiles para la eliminación de epítomos de células T asociados con el péptido 8.

15

Mutagénesis de aminoácidos en el péptido P7 (Tabla 2)

El péptido 7 contiene un aminoácido que es un anclaje primario potencial para la interacción con moléculas MHC de clase II, V823 (numeración según la secuencia madura sin dominio B). Por consiguiente, este residuo fue la diana para la mutación a residuos distintos de aquellos que potencialmente pueden ser anclajes primarios (es decir, A, C, D, E, K, N, P, Q, R, S, T).

20

La mutagénesis se realizó mediante overlap-PCR usando protocolos establecidos conocidos por los expertos en la materia. El péptido 7 se encuentra dentro de un fragmento de 766 bp de la secuencia de nucleótidos del factor VIII unido por los enzimas de restricción AvrII y PflM1. Los cebadores de PCR para la amplificación de este fragmento se sintetizaron correspondientemente para secuencias justo fuera de esta región (SEQ ID No. 57 y No. 58, abajo). Para la mutagénesis de V823X, se sintetizaron cebadores internos que se usaron como se describe a continuación:

25

30	SEQ ID No.57:	CGAGGACAGTTATGAAG	(gene nt.2214-2230)
	SEQ ID No.58:	AGTGGGATCTTCCATCTG	(gene nt.3108-3091)
	SEQ ID No.59:	ATGTGGGGAGCTACTCATCCC	(gene nt.2523-2503)
35	SEQ ID No.60:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATgcccTAAGAAACAG	(V823A)
	SEQ ID No.61:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATtgcTAAGAAACAG	(V823C)
	SEQ ID No.62:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATgacTAAGAAACAG	(V823D)
40	SEQ ID No.63:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATgagTAAGAAACAG	(V823E)
	SEQ ID No.64:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATgggTAAGAAACAG	(V823G)
	SEQ ID No.65:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATcacTAAGAAACAG	(V823H)
45	SEQ ID No.66:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATaagTAAGAAACAG	(V823K)
	SEQ ID No.67:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATaacTAAGAAACAG	(V823N)
	SEQ ID No.68:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATcccTAAGAAACAG	(V823P)
50	SEQ ID No.69:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATcagTAAGAAACAG	(V823Q)
	SEQ ID No.70:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATcgcTAAGAAACAG	(V823R)
	SEQ ID No.71:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATagcTAAGAAACAG	(V823S)
55	SEQ ID No.72:	GGGATGAGTAGCTCCCCACATaccTAAGAAACAG	(V823T)

60

La mutagénesis se realizó usando el mismo procedimiento general descrito más arriba para la mutagénesis del péptido 10, excepto que el fragmento 5' tenía una longitud de 310 bp y el fragmento 3' una longitud de 606 bp. El fragmento unido tenía una longitud de 894 bp y se digirió con AvrII y PflM1 y se clonó en pCIF8 digerido de forma similar.

65

Se seleccionó un clon con la secuencia correcta para cada mutante y se analizaron sus niveles de actividad y expresión como se describe más arriba. Las transfecciones se hicieron por duplicado y los sobrenadantes se mezclaron antes del análisis.

ES 2 319 758 T3

La comparación de los niveles de expresión y la actividad de los mutantes descrita más arriba reveló que se podían hacer numerosos cambios sin afectar sustancialmente a los niveles de expresión y actividad. Estos datos se representan en la Figura 7. La alteración de V823 en A, D, E, G, H, N, P, S o T rindió mutantes con expresión y actividad al menos equivalente a la del factor VIII wt. Por consiguiente, estas mutaciones son útiles para la eliminación de epítomos de células T asociados con el péptido 7.

Ejemplo 3

Se sintetizaron péptidos derivados de FVIII que contenían mutaciones y se analizó su capacidad continuada de provocar la proliferación de células T usando un ensayo *ex vivo*. Los péptidos fueron secuencias de 15meros y se diseñaron para analizar las sustituciones I1011A o I1011T en combinación con M1013K. Los péptidos se analizaron usando 4 muestras de PBMC de donantes que previamente habían respondido a la secuencia peptídica salvaje. En todos los casos los péptidos mutantes analizados fueron incapaces de estimular la proliferación con un SI > 2,0. En la Figura 8 se muestran los resultados de este ensayo incluyendo detalles del alotipo de los donantes y las secuencias peptídicas.

Las PBMC fueron estimuladas con antígenos de proteína y péptido en una placa de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 2×10^6 PBMC por pocillo. Las PBMC se incubaron durante 7 días a 37°C antes de ser pulsadas con ^3H -timidina. Los péptidos se generaron con las sustituciones especificadas y cada péptido se cribó individualmente respecto a PBMC aisladas de 4 donantes sanos que previamente mostraron respuesta a la secuencia peptídica P8 de FVIII. Se usó un péptido de control de hemaglutinina de gripe y un potente antígeno no-rellamada de hemocianina de lapa (KLH, del inglés keyhole limpet haemocyanin) en el ensayo de cada donante.

Los péptidos se disolvieron en DMSO hasta una concentración final de 10 mM, después estas soluciones madre se diluyeron 1/500 en medio AIM V (concentración final 20 μM). Los péptidos se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano obteniéndose una concentración final de 2 y 20 μM en 100 μl . La viabilidad de las PBMC descongeladas se evaluó mediante el colorante de exclusión azul tripan, después las células se resuspendieron a una densidad de 2×10^6 células/ml y 100 μl (2×10^5 PBMC/pocillo) se transfirieron a cada pocillo que contenía péptidos. Se analizaron los cultivos de los pocillos por triplicado a cada concentración de péptidos. Las placas se incubaron durante 7 días en una atmósfera humidificada de CO_2 5% a 37°C. Las células se pulsaron durante 18-21 horas con 1 μCi ^3H -Thy/pocillo antes de sembrar en filtermats. Se determinaron los valores de CPM usando un contador de placas Wallac microplate beta top (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como índices de estimulación, que se calcularon dividiendo el valor CPM del péptido de ensayo entre el valor CPM en los pocillos no tratados. Un índice de estimulación superior a 2 se considera una proliferación positiva.

REIVINDICACIONES

5 1. Una molécula modificada de factor VIII humano que no es inmunogénica o es menos inmunogénica que el factor VIII humano no modificado y tiene la misma especificidad biológica y actividad cuando se usa *in vivo*, que comprende la sustitución de un residuo aminoácido comparado con la molécula original no modificada, donde dicha sustitución del residuo aminoácido causa la reducción o eliminación de uno o varios epítomos de células T que actúan en la molécula original no modificada como ligandos de unión de MHC de clase II y estimulan células T, en que dicha sustitución del residuo aminoácido se selecciona del grupo consistente en: V823A, V823D, V82G, V823H, V823N, V823S, V823T.
10

15 2. Una molécula modificada de factor VIII según la reivindicación 1, que cuando se analiza en un ensayo biológico de proliferación celular inducida de células T humanas, muestra un índice de estimulación (SI, del inglés stimulation index) inferior a 2 e inferior al de la molécula original de factor VIII analizada en paralelo usando células del mismo donante, en la que dicho índice se toma como el valor de proliferación celular obtenido siguiendo la estimulación por la molécula de factor VIII dividido por la proliferación lograda en las células control que no están en contacto con la molécula de factor VIII, y donde la proliferación celular se mide por cualquier medio apropiado.

20 3. Una secuencia de ADN que codifica una molécula de factor VIII como se define en la reivindicación 1 o 2.

25 4. Una composición farmacéutica que comprende una molécula modificada de factor VIII de las reivindicaciones 1 o 2, opcionalmente junto a una carga, diluyente o excipiente aceptables.
30
35
40
45
50
55
60
65

FIGURA 1

TRRYLGAVELSW,	RRYYLGAVELSWD,	RYYLGAVELSWDY,	YYLGAVELSWDYM,
GAVELSWDYMOSD,	VELSWDYMOSDLG,	LSWDYMOSDLGEL,	WDYMOSDLGELPV,
DYMOSDLGELPVD,	SDLGELPVDARFP,	GELPVDARFPPRV,	LPVDARFPPRVFK,
ARFPPRVKSPFP,	PRVPKSPFPNTSV,	PKSPFPNTSVVYK,	KSPFPNTSVVYKK,
FPPNTSVVYKKTIL,	TSVVYKKTLEVEF,	SVVYKKTLEVEFT,	VVYKKTLEVEFTD,
KTLFVEFTDHLFN,	TLFVEFTDHLFNI,	LFVEFTDHLFNIA,	VEFTDHLFNIAKP,
EFTDHLFNIAKPR,	DHLFNIAKPRPPW,	HLENIAKPRPPWM,	FNIAKPRPPWMGL,
PPWMGLLGPTIQA,	PWMGLLGPTIQAE,	MGLLGPTIQAEVY,	GLLGPTIQAEVYD,
LLGPTIQAEVYDT,	PTIQAEVYDTVVI,	AEVYDTVVITLKN,	EVYDTVVITLKNM,
VYDTVVITLKNMA,	DTVVITLKNMASH,	TVVITLKNMASHP,	VVITLKNMASHPV,
ITLKNMASHPVSL,	TLKNMASHPVSLH,	KNMASHPVSLHAV,	SHPVSLHAVGVSY,
HPVSLHAVGVSYW,	PVSLHAVGVSYWK,	VSLHAVGVSYWKA,	HAVGVSYWKASEG,
VGVSYWKASEGAE,	VSYWKASEGAEYD,	SYWKASEGAEYDD,	EGAEYDDQTSQRE,
AEYDDQTSQREKE,	QREKEDDKVFPFGG,	DKVFPFGGSHTYVW,	KVFPFGGSHTYVWQ,
GSHTYVWQVLKEN,	HTYVWQVLKENGFP,	TYVWQVLKENGPM,	YVWQVLKENGPMA,
WQVLKENGPMASD,	QVLKENGPMASDF,	KENGPMASDPLCL,	GPMASDPLCLTYS,
DPLCLTYSYLSHV,	LCLTYSYLSHVDL,	LTYSYLSHVDLVK,	YSYLSHVDLVKDL,
SYLSHVDLVKDLN,	SHVDLVKDLNSGL,	VDLVKDLNSGLIG,	DLVKDLNSGLIGA,
KDLNSGLIGALLV,	DLNSGLIGALLVC,	LNSGLIGALLVCR,	SGLIGALLVCREG,
GLIGALLVCREGS,	IGALLVCREGSIA,	GALLVCREGSLAK,	ALLVCREGSLAKE,
LLVCREGSLAKEK,	GSLAKEKTQTLHK,	QTLHKFILLFAVE,	TLHKFILLFAVEFD,
HKFILLFAVFDEG,	KFILLFAVFDEGK,	FILLFAVFDEGKS,	ILLFAVFDEGKSW,
LLFAVFDEGKSWH,	FAVFDEGKSWHSE,	AVFDEGKSWHSET,	KSWHSETKNSIMQ,
NSLMQDRDAASAR,	SIMQDRDAASARA,	MQDRDAASARAWP,	RAWPKMHTVNGYV,
PKMHTVNGYVNR,	HTVNGYVNRSLPG,	NGYVNRSLPGLIG,	GYVNRSLPGLIGC,
RSLPGLIGCHRKS,	PGLIGCHRKSIVY,	GLIGCHRKSIVYWH,	KSVYWHVIGMGT,
SVYWHVIGMGTTP,	VYWHVIGMGTPE,	WHVIGMGTPEVH,	HVIGMGTPEVHS,
IGMGTPEVHSIF,	GTPPEVHSIFLEG,	PEVHSIFLEGHTE,	HSIFLEGHTFLVR,
SIFLEGHTFLVRN,	IFLEGHTFLVRNH,	GHTFLVRNHRQAS,	HTFLVRNHRQASL,
TFLVRNHRQASLE,	FLVRNHRQASLEI,	VRNHRQASLEISP,	ROASLEISPTITFL,
QASLEISPTITFLT,	ASLEISPTITFLTA,	LEISPTITFLTAQT,	ISPITFLTAQTLL,
SPITFLTAQTLLM,	ITFLTAQTLLMDL,	TFLTAQTLLMDLG,	QTLLMDLGQFLLF,
TLMDLGQFLLFCH,	LLMDLGQFLLFCH,	MDLGQFLLFCHIS,	DLGQFLLFCHISS,
GQFLLFCHISSHQ,	QFLLFCHISSHQH,	FLLFCHISSHQHD,	LLFCHISSHQHDG,
CHISSHQHDGMEA,	SSHQHDGMEAYVK,	DGMEAYVKVDSCP,	EAYVKVDSCPPEP,
AYVKVDSCPPEEPQ,	VKVDSCPPEEPQLR,	DSCPPEEPQLRMKN,	PQLRMKNNEEAED,
LRMKNNEEAEDYD,	NEEAEDYDDDLTD,	EDYDDDLTDSEMD,	DDDLTDSEMDVVR,
DDDLTDSEMDVVR,	SEMDVVRFDDDNS,	MDVVRFDDDNSPS,	DVVRFDDDNSPSF,
VVRFDDDNSPSFI,	VRFDDDNSPSFIQ,	DNSPSFIQIRSV,	PSFIQIRSVAKKH,
SFIQIRSVAKKH,	IQIRSVAKKHPKT,	RSVAKKHPKTWHV,	KTWHVYIAAEED,
TWHVYIAAEEDW,	VHYIAAEEDWDY,	HYIAAEEDWDYA,	EDWDYAPLVLAPD,
WDYAPLVLAPDDR,	APLVLAPDDRSYK,	PLVLAPDDRSYKS,	LVLAPDDRSYKSQ,
VLAPDDRSYKSQY,	RSYKSQYLNNGPQ,	YKSQYLNNGPQRI,	SQYLNNGPQRIGR,
QYLNNGPQRIGRK,	NGPQRIGRKYKVV,	QRIGRKYKVVRFM,	RKYKVVRFMAYTD,
KKVRFMAYTDETF,	KVRFMAYTDETFK,	VRFMAYTDETFKT,	RFMAYTDETFKTR,
FMAYTDETFKTRE,	MAYTDETFKTREA,	YTFKTRTREAIO,	ETFKTRTREAIOHES,
FKTRTREAIOHESGI,	TREAIOHESGILG,	EATIOHESGILGPL,	QHESGILGPLLYG,
SGILGPLLYGEVG,	GILGPLLYGEVGD,	GPLLYGEVGDITLL,	PLLYGEVGDITLLI,
LLYGEVGDITLLII,	GEVGDITLLIIFKN,	DTLLIIFKNQASR,	TLIIIFKNQASRP,
LLIIFKNQASRPY,	LIIFKNQASRPYN,	IIFKNQASRPYNI,	SRPYNIPHGITD,
RPYNIPHGITDVR,	YNIYPHGITDVRP,	NIYPHGITDVRPL,	PHGITDVRPLYSR,
HGITDVRPLYSRR,	TDVRPLYSRRPK,	RPLYSRRPKGVK,	PLYSRRPKGVKH,
RRLPKGVKHLKDF,	KGVKHLKDFPILP,	KHLKDFPILPGEI,	LKDFPILPGEIFK,
KDFPILPGEIFKY,	FPILPGEIFKYKW,	PILPGEIFKYKWT,	GEIFKYKWTVTVE,
EIFKYKWTVTVED,	FKYKWTVTVEDGP,	YKWTVTVEDGPTK,	WTVTVEDGPTKSD,
VTVEDGPTKSDPR,	GPTKSDPRCLTRY,	SDPRCLTRYSSF,	RCLTRYSSFVNM,

Figura 1 (continuación)

TRYSSFVNMERD,	RYSSFVNMERDL,	SSFVNMERDLASG,	SFVNMERDLASGL,
VNMERDLASGLIG,	NMERDLASGLIGP,	RDLASGLIGPLLI,	DLASGLIGPLLIC,
LASGLIGPLLICY,	SGLIGPLLICICYKE,	GLIGPLLICICYKES,	GPLLICICYKESVDQ,
PLLICICYKESVDQR,	LLICYKESVDQRG,	ICYKESVDQRGNQ,	CYKESVDQRGNQI,
KESVDQRGNQIMS,	ESVDQRGNQIMSD,	NQIMSDKRNVILF,	QIMSDKRNVILFS,
RNVILFSVFDENR,	NVILFSVFDENRS,	VILFSVFDENRSW,	ILFSVFDENRSWY,
LFSVFDENRSWYL,	FSVFDENRSWYLT,	SVFDENRSWYLTE,	RSWYLTENIQRF,
SWYLTENIQRF,	WYLTENIQRFPLN,	ENIQRFPLNPAGV,	QRFPLNPAGVQLE,
RFLPNPAGVQLED,	AGVQLEDPEFQAS,	GVQLEDPEFQASN,	VQLEDPEFQASNI,
QLEDPEFQASNIM,	PEFQASNIMHSIN,	SNIMHSINGYVFD,	NIMHSINGYVFD,
HSINGYVFDLQSL,	INGYVFDLQSLSV,	NGYVFDLQSLSVC,	GYVFDLQSLSVCL,
YVFDLQSLSVCLH,	VFDLQSLSVCLHE,	DSLQSLSVCLHEVA,	LQSLSVCLHEVAYW,
LSVCLHEVAYWYI,	VCLHEVAYWYILS,	HEVAYWYILSIGA,	VAYWYILSIGAQT,
AYWYILSIGAQT,	YWYILSIGAQTDF,	WYILSIGAQTDFL,	YILSIGAQTDFLS,
ILSIGAQTDFLSV,	LSIGAQTDFLSVF,	IGAQTDFLSVFFS,	TDFLSVFFSGYTF,
DFLSVFFSGYTFK,	LSVFFSGYTFKHK,	SVFFSGYTFKHKM,	VFFSGYTFKHKMV,
FSGYTFKHKMVYE,	SGYTFKHKMVYED,	YTFKHKMVYEDTL,	HKMVYEDTLTLF,
KMVYEDTLTLFPP,	MVYEDTLTLFPPS,	DTLTLFPPSGETV,	LTLFPPSGETVFM,
TLFPPSGETVEMS,	FPPSGETVFMSE,	SGETVFMSEMPG,	ETVFMSEMPGLW,
TVFMSEMPGLWI,	VFMSEMPGLWIL,	MSMENPGLWILGC,	PGLWILGCHNSDF,
GLWILGCHNSDFR,	LWILGCHNSDFRN,	WILGCHNSDFRNR,	GCHNSDFRNRGMT,
CHNSDFRNRGMTA,	SDFRNRGMTALLK,	RGMTALLKVSSCD,	TALLKVSSCDKNT,
ALLKVSSCDKNTG,	LKVSSCDKNTGDY,	GDYEDSYEDISA,	DYEDSYEDISAY,
EDSYEDISAYLLS,	DSYEDISAYLLSK,	EDISAYLLSKNNA,	DISAYLLSKNNAI,
ISAYLLSKNNAI,	SAYLLSKNNAIEP,	AYLLSKNNAIEP,	YLLSKNNAIEP,
SKNNAIEP,	NAIEPRSFQNSR,	RSFQNSRHPSTR,	KQFNATTIPENDI,
TTIPENDIEKTD,	NDIEKTDPWFAHR,	TDPWFARHTPMPK,	DPWFARHTPMPKI,
PWFARHTPMPKIQ,	TPMPKIQNVSSSD,	PKIQNVSSSDLML,	QNVSSDLMLLRL,
NVSSDLMLLRLQ,	SDLMLLRLQSPPT,	DLLMLLRLQSPPT,	LLMLLRLQSPPTPHG,
LMLLRLQSPPTPHGL,	MLLRLQSPPTPHGLS,	HGLSLSDLQEAQY,	GLSLSDLQEAQY,
LSDLQEAQYET,	SDLQEAQYETFSD,	AKYETFSDDPSPG,	ETFSDDPSPGAI,
PSPGAIDSNNSLS,	SPGAIDSNNSLSE,	GAIDSNNSLSEMT,	NLSSEMTHFRPQL,
SEMTHFRPQLHHS,	THFRPQLHHSQDM,	PQLHHSQDMVFT,	HSGDMVFTPESGL,
GDMVFTPESGLQL,	DMVFTPESGLQLR,	MVFTPESGLQLRL,	SGLQLRLNEKLG,
LQLRLNEKLGTTA,	LRLNEKLGTTAAT,	RLNEKLGTTAATE,	EKLGTTAATELKK,
KLGTAAATELKKL,	TAATELKKLDFKV,	TELKKLDFKVSST,	ELKKLDFKVSSTS,
KKLDFKVSSTSNN,	KLDFKVSSTSNNL,	LDFKVSSTSNNLI,	FKVSSTSNNLIST,
TSNNLISTIPSDN,	NNLISTIPSDNLA,	NLISTIPSDNLAA,	STIPSDNLAAAGT,
SDNLAAGTDNTSS,	DNLAAGTDNTSSL,	LAAGTDNTSSLGP,	DNTSSLGPPSMPV,
SSLGPPSMPVHYD,	PSMPVHYDSQLDT,	MPVHYDSQLDTTL,	PVHYDSQLDTTLF,
VHYDSQLDTTLF,	HYDSQLDTTLFGK,	SQLDTTLFGKKS,	TTLFGKKSPLTE,
TLFGKKSPLTES,	SPLTESGGPLSLS,	GPLSLSSEENNSK,	LSSLSEENNSKLL,
SEENNSKLLSESG,	NDSKLLSEGLMNS,	SKLSEGLMNSQE,	KLSEGLMNSQES,
SGLMNSQESSWGK,	GLMNSQESSWGKN,	LMNSQESSWGKNV,	SSWGKNVSTESG,
SWGKNVSTESGR,	KNVSTESGRLEFK,	GRLEFKGRAHGPA,	RLFKGRAHGPA,
FKGRAHGPAALLT,	AHGPAALLTKDNAL,	HGPAALLTKDNALF,	PALLTKDNALFKV,
ALLTKDNALFKVS,	DNALFKVSISLLK,	NALFKVSISLLKT,	ALFKVSISLLKTN,
FKVSISLLKTNKT,	KVSISLLKTNKTS,	VSISLLKTNKTSN,	SISLLKTNKTSNN,
ISLLKTNKTSNNS,	SLLKTNKTSNNSA,	LLKTNKTSNNSAT,	KTSNNSATNRKTH,
NRKTHIDGPSLLI,	THIDGPSLLIENS,	DGPSLLIENSPSV,	GPSLLIENSPSVW,
PSLLIENSPSVWQ,	SLLIENSPSVWQNI,	LLIENSPSVWQNI,	IENSPSVWQNI,
PSVWQNI,	SVWQNI,	QNI,	NILESDFEKKV,
DTEFFKVTPLIHD,	TEFFKVTPLIHDR,	FKVTPLIHDRML,	KKVTPLIHDRMLM,
VTPLIHDRMLMDK,	TPLIHDRMLMDKN,	PLIHDRMLMDKNA,	IHDRMLMDKNATA,
HDRMLMDKNATAL,	DRMLMDKNATALR,	RMLMDKNATALRL,	MLMDKNATALRLN,
DNATALRLNHMS,	NATALRLNHMSNK,	TALRLNHMSNKTT,	LRLNHMSNKTTSS,
NHMSNKTTSSKNM,	KNATALRLNHMSN,	ALRLNHMSNKTTT,	SKNMEMVQKKEG,
KNMEMVQKKEGP,	MEMVQKKEGP,	EMVQKKEGP,	EGP,
GPIPDAQNPDMS,	PDAQNPDMSFFKM,	PDMSFFKMLFLP,	PDMSFFKMLFLPE,
MSFFKMLFLPESAR,	FFKMLFLPESAR,	FFKMLFLPESARW,	FKMLFLPESARWI,
KMLFLPESARWIQ,	MLFLPESARWIQR,	LFLPESARWIQRT,	SARWIQRTHGKNS,
ARWIQRTHGKNSL,	RWIQRTHGKNSLN,	IQRTHGKNSLNSG,	NLSNSGQGPSPKQ,
PKQLVSLGPEKSV,	KQLVSLGPEKSVE,	QLVSLGPEKSVEG,	LVSLSGPEKSVEGQ,
VSLGPEKSVEGQN,	LGPEKSVEGQNFL,	GPEKSVEGQNFLS,	KSVEGQNFLSEKN,

Figura 1 (continuación)

SVEGQNFLSEKNK,	QNFLSEKNKVVV,	QNFLSEKNKVVVG,	NFLSEKNKVVVGK,
NKVVGKGEFTKD,	KVVVGKGEFTKDV,	VVVGKGEFTKDVG,	KGEFTKDVGLKEM,
GEFTKDVGLKEMV,	KDVGLKEMVFPSS,	VGLKEMVFPSSRN,	GLKEMVFPSSRNL,
LKEMVFPSSRNLF,	KEMVFPSSRNLF,	EMVFPSSRNLF,	MVFPSSRNLF,
SSRNLFNLNDNL,	SRNLFNLNDNLH,	RNLFLNLNDNLHE,	NLFLNLNDNLHEN,
LFLNLNDNLHENN,	LTNLNDNLHENNTH,	TNLNDNLHENNTHN,	NLDNLHENNTHNQ,
LDNLHENNTHNQE,	DNLHENNTHNQEK,	EKKIQEEIEKKET,	KKIQEEIEKKETL,
QEEIEKKETLIQE,	EEIEKKETLIQEN,	IEKKETLIQENVV,	KKETLIQENVVLP,
ETLIQENVVLPQI,	TLIQENVVLPQIH,	IQENVVLPQIHTV,	ENVVLPQIHTVTG,
NVVLQIHTVTGT,	VVLQIHTVTGK,	LPQIHTVTGKNF,	QIHTVTGKKNFM,
IHTVTGKKNFMKN,	HTVTGKKNFMKNL,	KNFMKNLFLSTR,	NFMKNLFLSTRQ,
FMKNLFLSTRQN,	MKNLFLSTRQNV,	KNLFLSTRQNV,	NLFLSTRQNV,
LFLSTRQNV,	FLLSTRQNV,	RQNV,	QNV,
EGSYDGAYAPVLO,	GSYDGAYAPVLOD,	DGAYAPVLODFRS,	GAYAPVLODFRSL,
YAPVLODFRSLND,	APVLODFRSLNDS,	PVLODFRSLNDST,	LQDFRSLNDSTNR,
QDFRSLNDSTNRT,	DFRSLNDSTNRTK,	FRSLNDSTNRTKK,	RSNDSTNRTKKH,
AHFSKKGEEENLE,	EENLEGLGNQTKQ,	ENLEGLGNQTKQI,	LEGLGNQTKQIVE,
EGLGNQTKQIVEK,	LGNQTKQIVEKYA,	KQIVEKYACTTRI,	QIVEKYACTTRIS,
EKYACTTRISPNT,	TTRISPNTSQONF,	TRISPNTSQONFV,	NTSQONFVQORSK,
TSQONFVQORSKR,	QONFVQORSKRAL,	QNFVQORSKRALK,	NFVQORSKRALKQ,
QORSKRALKQFRLE,	RALKQFRLEPLEET,	KQFRLEPLEETELE,	QFRLEPLEETELEK,
FRLEPLEETELEKR,	LPLEETELEKRII,	PLEETELEKRIIV,	LEETELEKRIIVD,
TELEKRIIVDDTS,	EKRIIVDDTSTQW,	KRIIVDDTSTQWS,	RIIVDDTSTQWSK,
IIVDDTSTQWSKN,	VDDTSTQWSKNMK,	TQWSKNMKHLTPS,	SKNMKHLTPSTLT,
KNMKHLTPSTLTQ,	KHLTPSTLTQIDY,	PSTLTQIDYNEKE,	STLTQIDYNEKEK,
LTQIDYNEKEKGA,	TQIDYNEKEKGAI,	QIDYNEKEKGAIT,	IDYNEKEKGAITQ,
EKEKGAITQSPLS,	GAITQSPLSDCLT,	SPLSDCLTRSHSI,	SDCLTRSHSIPOA,
DCLTRSHSIPOAN,	SHSIPOANRSPPL,	HSIPOANRSPPLI,	RSPLPIAKVSSFP,
SPLPIAKVSSFPS,	PLPIAKVSSFPSI,	LPIAKVSSFPSIR,	IAKVSSFPSIRPI,
AKVSSFPSIRPIY,	VSSFPSIRPIYLT,	SSFPSIRPIYLTR,	FPSIRPIYLRVLP,
PSIRPIYLRVLF,	SIRPIYLRVLFQ,	RPIYLRVLFQDN,	PIYLRVLFQDNS,
IYLRVLFQDNSS,	LTRVLFQDNSSHL,	TRVLFQDNSSHL,	RVLFQDNSSHLPA,
VLFQDNSSHLPA,	QDNSSHLPAASYSR,	NSSHLPAASYSRKK,	SSHLPAASYSRKKD,
SHLPAASYSRKKDS,	AASYSRKKDSGVQE,	ASYSRKKDSGVQES,	KKDSGVQESSHFL,
KDSGVQESSHFLQ,	DSGVQESSHFLQG,	SGVQESSHFLQGA,	VQESSHFLQGAKK,
SHFLQGAKKNNLS,	HFLQGAKKNNLSL,	NNLSLAILTLEMT,	NLSLAILTLEMTG,
LSLAILTLEMTGD,	LAILTLEMTGDQRE,	AILTLEMTGDQRE,	LTMLEMTGDQREVG,
TLEMTGDQREVG,	LEMTGDQREVGSL,	TGDQREVGSLGTS,	QREVGSLGTSATN,
REVGSLGTSATNS,	VGSLGTSATNSVT,	GSLGTSATNSVTY,	KNNLSLAILTLEM,
NSVTYKKVENTVL,	SVTYKKVENTVLP,	VTYKKVENTVLPK,	KKVENTVLPKPD,
NTVLEKPKDLPKTS,	PDLPKTSGKVELL,	SGKVELLKVHIY,	GKVELLKVHIYQ,
VELLEKPVHIYQD,	ELLKPVHIYQKDL,	LKPVHIYQKDLFP,	PKVHIYQKDLFPT,
VHIYQKDLFPTET,	HLYQKDLFPTETS,	KDLFPTETSNGSP,	DLFPTETSNGSPG,
PHLDLVEGSLIQ,	GHLDLVEGSLIQG,	LDLVEGSLIQGTE,	DLVEGSLIQGTEG,
VEGSLIQGTEGAI,	EGSLIQGTEGAIK,	GSLIQGTEGAIKW,	SLIQGTEGAIKWN,
GAIKWNEANRPGK,	AIKWNEANRPGKV,	IKWNEANRPGKVP,	RPKVPFLRVATE,
GKVPFLRVATESS,	KVPFLRVATESSA,	VPFLRVATESSAK,	PFLRVATESSAKT,
FLRVATESSAKTP,	LRVATESSAKTPS,	VATESSAKTPSKL,	SKLLDPLAWDNHY,
KLLDPLAWDNHYG,	LLDPLAWDNHYGT,	LDPLAWDNHYGTQ,	DPLAWDNHYGTQI,
PLAWDNHYGTQIP,	LAWDNHYGTQIPK,	DNHYGTQIPKEEW,	NHYGTQIPKEEWK,
GTQIPKEEWKSQE,	TQIPKEEWKSQEK,	KEEWKSQEKSPK,	EEWKSQEKSPKPT,
KSQEKSPKPTAFK,	SQEKSPKPTAFKK,	KTAFKKDTILSL,	QEKSPKPTAFKKK,
KSPTAFKKKDTI,	SPTAFKKKDTI,	KTAFKKKDTILSL,	TAFKKKDTILSLN,
AFKKKDTILSLNA,	DTILSLNACESNH,	TILSLNACESNHA,	ILSLNACESNHAI,
LSLNACESNHAI,	HAIAINEGQNKPE,	AIAAINEGQNKPE,	IAAINEGQNKPEI,
AINEGQNKPEIE,	GQNKPEIEVTWAK,	QNKPEIEVTWAKQ,	GQNKPEIEVTWAK,
QNKPEIEVTWAKQ,	PEIEVTWAKQGRTE,	EIEVTWAKQGRTE,	IEVTWAKQGRTER,
EVTWAKQGRTERL,	VTWAKQGRTERLC,	TERLCSONPVLK,	ERLCSONPVLKR,
NPPVLKRHQREIT,	PPVLKRHQREITR,	PVLKRHQREITRT,	LKRHQREITRTTL,
KRHQREITRTTLO,	REITRTTLOSDQE,	TTLOSDQEEIDYD,	QEEIDYDDTISVE,
EEIDYDDTISVEM,	EIDYDDTISVEMK,	IDYDDTISVEMKK,	DTISVEMKKEDFD,
TISVEMKKEDFDI,	ISVEMKKEDFDIY,	SVEMKKEDFDIYD,	VEMKKEDFDIYDE,
EDFDIYDEDENQS,	DFDIYDEDENQSP,	FDIYDEDENQSPR,	DIYDEDENQSPRS,

Figura 1 (continuación)

YDEDENQSPRSFQ,	PRSFQKKTRHYFI,	RSFQKKTRHYFIA,	TRHYFIAAVERLW,
RHYFIAAVERLWD,	HYFIAAVERLWDY,	YFIAAVERLWDYG,	IAAVERLWDYGMS,
AAVERLWDYGMSS,	ERLWDYGMSSSPH,	RLWDYGMSSSPHV,	LWDYGMSSSPHVL,
WDYGMSSSPHVL,	YGMSSSPHVLNR,	MSSSPHVLNRRAQ,	SSSPHVLNRRAQS,
PHVLNRRAQSGSV,	HVLNRRAQSGSVP,	RAQSGSVPQFKKV,	QSGSVPQFKKVVF,
GSVPQFKKVVFQE,	VPQFKKVVFQEFT,	PQFKKVVFQEFTD,	FKKVVFQEFTDGS,
KKVVFQEFTDGSF,	KVVVFQEFTDGSFT,	VVFQEFTDGSFTQ,	VQEFTDGSFTQF,
QEFTDGSFTQPLY,	GSFTQPLYRGELN,	QPLYRGELNEHLG,	PLYRGELNEHLGL,
GELNEHLGLLGPY,	LNEHLGLLGPYIR,	NEHLGLLGPYIRA,	EHLGLLGPYIRAE,
LGLLGPYIRAEVE,	GLLGPYIRAEVED,	LGPIRAEVEDNI,	GPYIRAEVEDNIM,
PYIRAEVEDNIMV,	YIRAEVEDNIMVT,	RAEVEDNIMVTFR,	AEVEDNIMVTFERN,
EDNIMVTFRNQAS,	DNIMVTFRNQASR,	NIMVTFRNQASRP,	IMVTFRNQASRPY,
MVTFRNQASRPYS,	VTFRNQASRPYSF,	ASRPYSFYSSLIS,	SRPYSFYSSLISY,
RPYSFYSSLISYE,	YSFYSSLISYEED,	SFYSSLISYEEDQ,	YSSLISYEEDQRP,
SSLISYEEDQROG,	SLISYEEDQROGA,	LISYEEDQROGAE,	ISYEEDQROGALP,
KNFVKPNETKTYF,	NFVKPNETKTYFW,	KTYFWKVQHMAP,	TYFWKVQHMAPT,
YFWKVQHMAPTK,	WKVQHMAPTKDE,	HHMAPTKDEFDCK,	TKDEFDCKAWAYF,
DEFDCKAWAYFSD,	KAWAYFSDVDLEK,	WAYFSDVDLEKDV,	AYFSDVDLEKDVH,
SDVDLEKDVHSGL,	DVDLEKDVHSGLI,	VDLEKDVHSGLIG,	LEKDVHSGLIGPL,
KDVHSGLIGPLLV,	DVHSGLIGPLLV,	VHSGLIGPLLVCH,	SGLIGPLLVCHTN,
GLIGPLLVCHTNT,	IGPLLVCHTNTLN,	GPLLVCHTNTLNP,	PLLVCHTNTLNPA,
LLVCHTNTLNPAH,	NTLNPAHGRQVTV,	AHGRQVTVQEFAL,	RQVTVQEFALFFT,
VTVQEFALFFTI,	TVQEFALFFTIFD,	QEFALFFTIFDET,	FALFFTIFDETKS,
ALFFTIFDETKSW,	LFFTIFDETKSWY,	FTIFDETKSWYFT,	TIFDETKSWYFTE,
KSWYFTENMERN,	SWYFTENMERNCR,	WYFTENMERNCR,	FTENMERNCRAPC,
ENMERNCRAPCNI,	PCNIQMEDPTFKE,	CNIQMEDPTFKEN,	IQMEDPTFKENYR,
PTFKENYRFHAIN,	ENYRFHAINGYIM,	NYRFHAINGYIMD,	YRFHAINGYIMDT,
HAINGYIMDTLPG,	AINGYIMDTLPLG,	NGYIMDTLPLGLVM,	GYIMDTLPLGLVMA,
YIMDTLPLGLVMAQ,	DTLPLGLVMAQDQR,	TPLGLVMAQDQRI,	PGLVMAQDQRIRW,
GLVMAQDQRIRWY,	LVMAQDQRIRWYL,	MAQDQRIRWYLLS,	QRIRWYLLSMGSN,
IRWYLLSMGSNEN,	RWYLLSMGSNENI,	WYLLSMGSNENIH,	YLLSMGSNENIHS,
LSMGSNENIHSIH,	GSNENIHSIHFSG,	ENIHSIHFSGHVF,	HSIHFSGHVFTR,
IHSGHVFTRKKE,	HFSGHVFTRKKE,	GHVFTRKKEEYK,	HVFTRKKEEYKM,
YTRKKEEYKMAL,	VRKKEEYKMALYN,	KEEYKMALYNLTP,	EYKMALYNLTPYPM,
YKMALYNLTPGVF,	MALYNLTPGVFET,	ALYNLTPGVFETV,	YNLTPGVFETVEM,
NLTPGVFETVEM,	PGVFETVEMLPSK,	GVFETVEMLPSKA,	FETVEMLPSKAGI,
ETVEMLPSKAGIW,	VEMLPSKAGIWRV,	EMLPSKAGIWRVE,	MLPSKAGIWRVEC,
AGIWRVECLIGEH,	GIWRVECLIGEHL,	WRVECLIGEHLHA,	ECLIGEHLHAGMS,
CLIGEHLHAGMST,	EHLHAGMSTLFLV,	HLHAGMSTLFLVY,	AGMSTLFLVYSNK,
STLFLVYSNKCQT,	TLFLVYSNKCQTP,	LFLVYSNKCQTP,	FLVYSNKCQTPFG,
LVYSNKCQTPGLM,	YSNKCQTPGLMAS,	QTPGLMASGHIRD,	TPLGMASGHIRDF,
LGMASGHIRDFQI,	SGHIRDFQITASG,	GHIRDFQITASGQ,	IRDFQITASQYQG,
RDFQITASQYQGW,	FQITASQYQGWA,	EHLHAGMSTLFLV,	HLHAGMSTLFLVY,
AGMSTLFLVYSNK,	STLFLVYSNKCQT,	TLFLVYSNKCQTP,	LFLVYSNKCQTP,
FLVYSNKCQTPGL,	LVYSNKCQTPGLM,	YSNKCQTPGLMAS,	QTPGLMASGHIRD,
TPLGMASGHIRDF,	LGMASGHIRDFQI,	SGHIRDFQITASG,	GHIRDFQITASGQ,
IRDFQITASQYQG,	RDFQITASQYQGW,	FQITASQYQGWA,	TASQYQGWAPKL,
SGYQGWAPKLAR,	GOYQGWAPKLARL,	GOWAPKLARLHYS,	QWAPKLARLHYSG,
PKLARLHYSGSIN,	ARLHYSGSINAW,	LHYSGSINAWSTK,	GSINAWSTKEPFS,
NAWSTKEPFSWIK,	EPFSWIKVDLLAP,	FSWIKVDLLAPMI,	SWIKVDLLAPMII,
WIKVDLLAPMIIH,	IKVDLLAPMIIHG,	VDLLAPMIIHGK,	DLAPMIIHGKIKT,
LLAPMIIHGKIQ,	APMIIHGKIQGA,	PMIIHGKIQGAR,	MIHGKIQGARQ,
HGIKTQGARQKFS,	GIKTQGARQKFS,	IKTQGARQKFS,	GARQKFSLLYSQ,
QKFSLLYSQFII,	FSSLYISQFIIMY,	SSLYISQFIIMYS,	SLYISQFIIMYSL,
LYISQFIIMYSLD,	YISQFIIMYSLDG,	SQFIIMYSLDGKK,	QFIIMYSLDGKKW,
FIIMYSLDGKKWQ,	IIMYSLDGKKWQT,	IMYSLDGKKWQTY,	YSLDGKKWQTYRG,
KKWQTYRGNSTGT,	QTYRGNSTGTLMV,	GTLMVFFGNVDSS,	TLMVFFGNVDSSG,
LMVFFGNVDSSGI,	MVFFGNVDSSGIK,	VFFGNVDSSGIKH,	FFGNVDSSGIKHN,
GNVDSSGIKHNIF,	VDSSGIKHNIFNP,	SGIKHNIFNPPII,	GIKHNIFNPPIIA,
IKHNIFNPPIIAR,	KHNIFNPPIIARY,	HNFNPPIIARYI,	NIFNPPIIARYIR,
NPPIIARYIRLHP,	PPIIARYIRLHPHT,	PIIARYIRLHPHTH,	ARYIRLHPHTHYSI,
YIRLHPHTHYSIR,	IRLHPHTHYSIRST,	THYSIRSTLRMEL,	YSIRSTLRMELMG,
STLRMELMGCDLN,	TLRMELMGCDLNS,	LRMELMGCDLNSC,	MELMGCDLNSCSM,
ELMGCDLNSCSMP,	LMGCDLNSCSMPL,	CDLNSCSMPLGME,	CSMPLGMEKALS,

Figura 1 (continuación)

SMP LGMESKAISD,	MPL GMESKAISDA,	LG MESKAISDAQI,	GMESKAISDAQIT,
SKAISDAQITASS,	KAISDAQITASSY,	AISDAQITASSYF,	DAQITASSYFTNM,
AQITASSYFTNMF,	TASSYFTNMFATW,	SSYFTNMFATWSP,	SYFTNMFATWSPS,
TNMFATWSPSKAR,	NMFATWSPSKARL,	FATWSPSKARLHL,	ATWSPSKARLHLQ,
PSKARLHLQGRSN,	ARLHLQGRSNAWR,	LHLQGRSNAWRPQ,	QGRSNAWRPQVNN,
NAWRPQVNNPKEW,	PQVNNPKEWLQVD,	NNPKEWLQVDFQK,	KEWLQVDFQKTMK,
EWLQVDFQKTMKV,	LQVDFQKTMKVTG,	VDFQKTMKVTGVT,	KTMKVTGVTTQGV,
MKVTGVTTQGVKS,	TGVTTQGVKSLLT,	VTTQGVKSLLTSM,	QGVKSLLTSMYVK,
GVKSLLTSMYVKE,	KSLLTSMYVKEFL,	SLLTSMYVKEFLI,	LTSMYVKEFLISS,
TSMYVKEFLISS,	SMYVKEFLISSSQ,	MYVKEFLISSSQD,	YVKEFLISSSQDG,
KEFLISSQDGHQ,	EFLISSQDGHQW,	FLISSQDGHQWT,	ISSSQDGHQWTLF,
SQDGHQWTLFFQ,	GHQWTLFFQNGKV,	HOWTLFFQNGKVK,	WTLFFQNGKVKVF,
TLFFQNGKVKVFQ,	LFFQNGKVKVFQ,	NGKVKVFQGNQDS,	GKVKVFQGNQDSF,
VKVFQGNQDSFTP,	KVFQGNQDSFTP,	DSFTPVVNSLDP,	TPVVNSLDPPLLT,
PVVNSLDPPLLTR,	NSLDPPLLTRYL,	SLDPPLLTRYLRI,	PPLLTRYLRIHPQ,
PLLTRYLRIHPQS,	TRYLRIHPQSWVH,	RYLRIHPQSWVHQ,	LRIHPQSWVHQIA,
HPQSWVHQIALRM,	QSWVHQIALRMEV,	SWVHQIALRMEVL,	WVHQIALRMEVLG,
HQIALRMEVLGCE,	IALRMEVLGCEAQ,	LRMEVLGCEAQDL,	

FIGURA 2

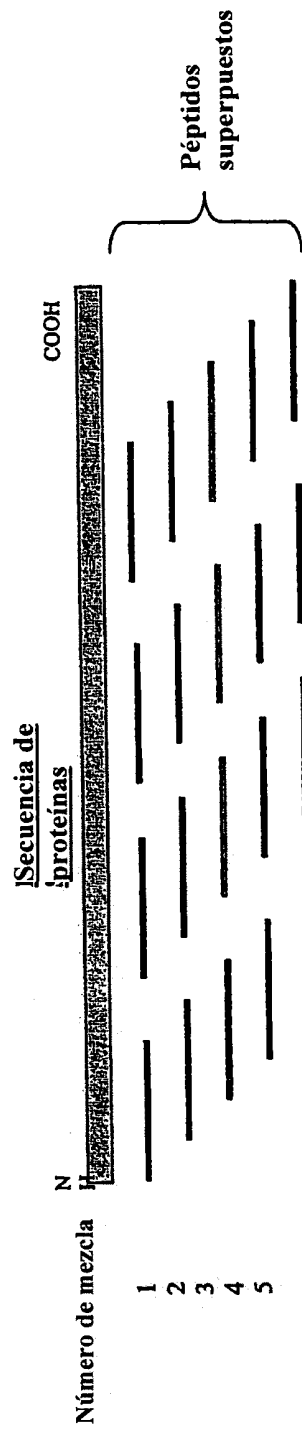


FIGURA 3

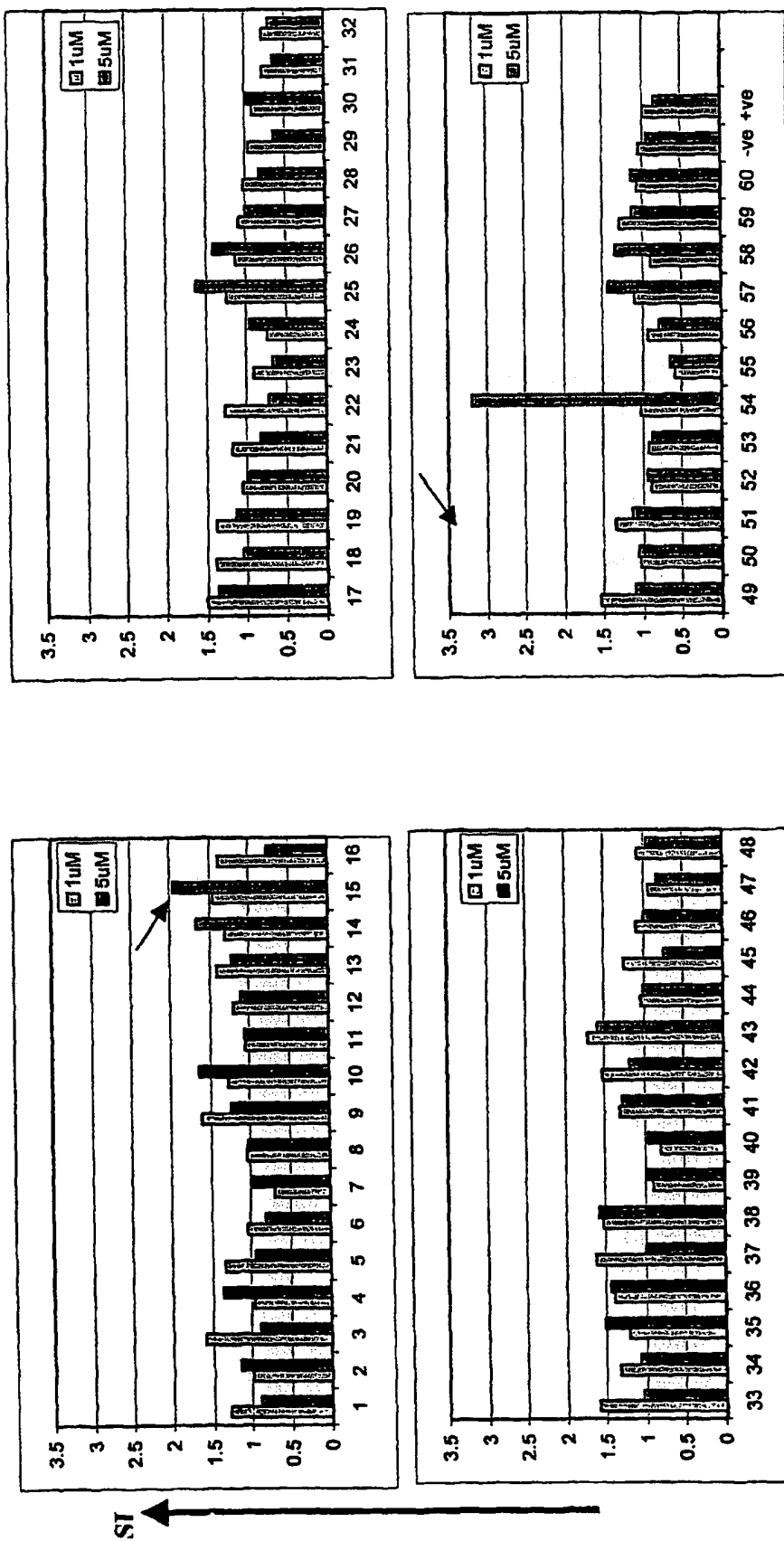


FIGURA 4

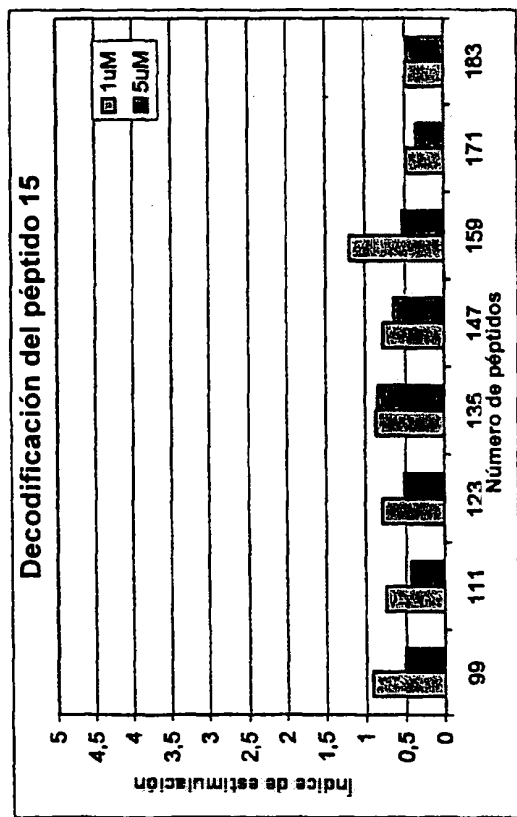
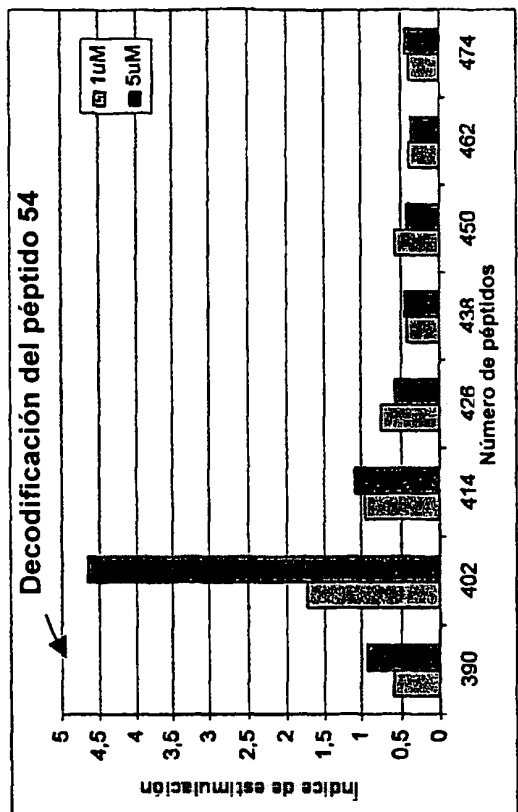


FIGURA 5A

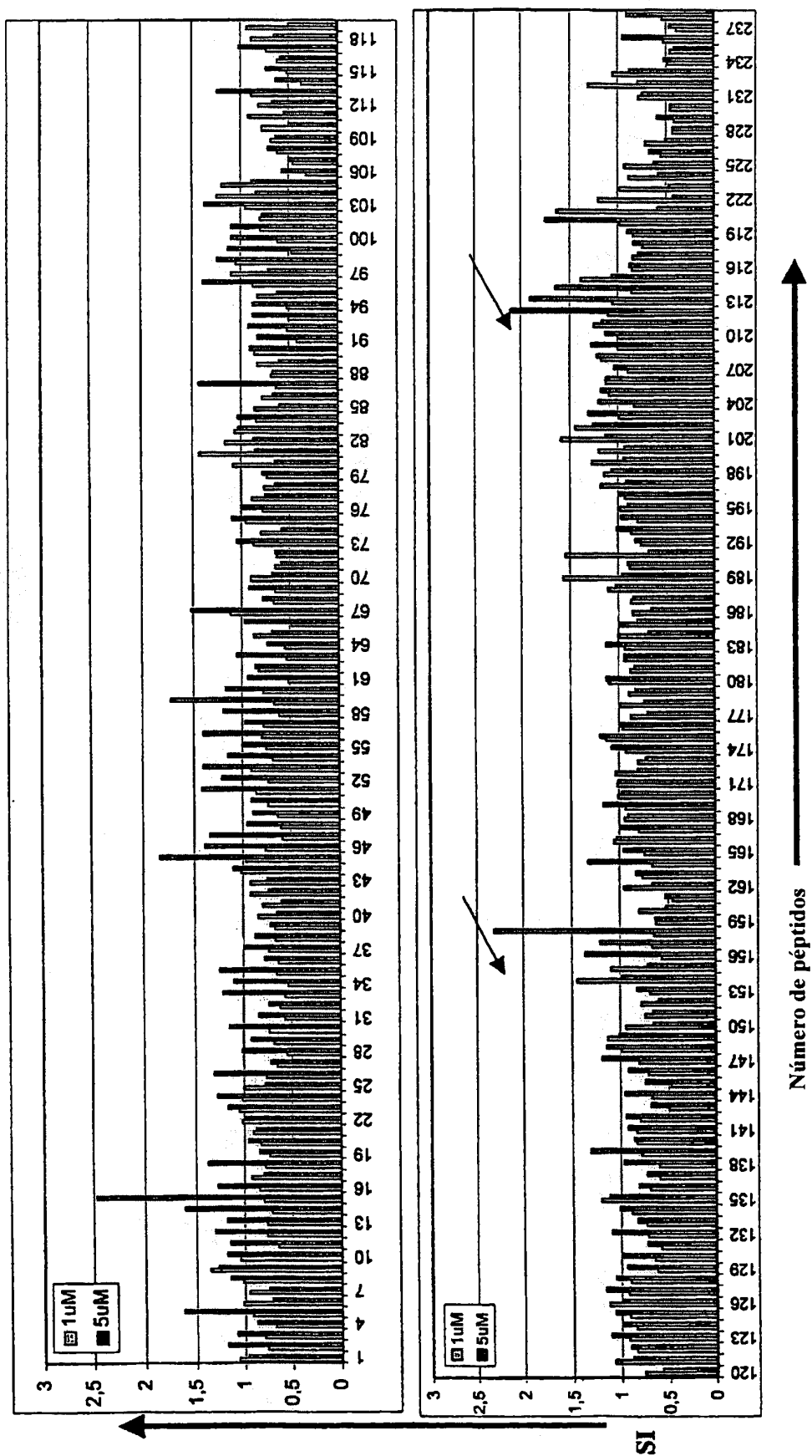


FIGURA 5B

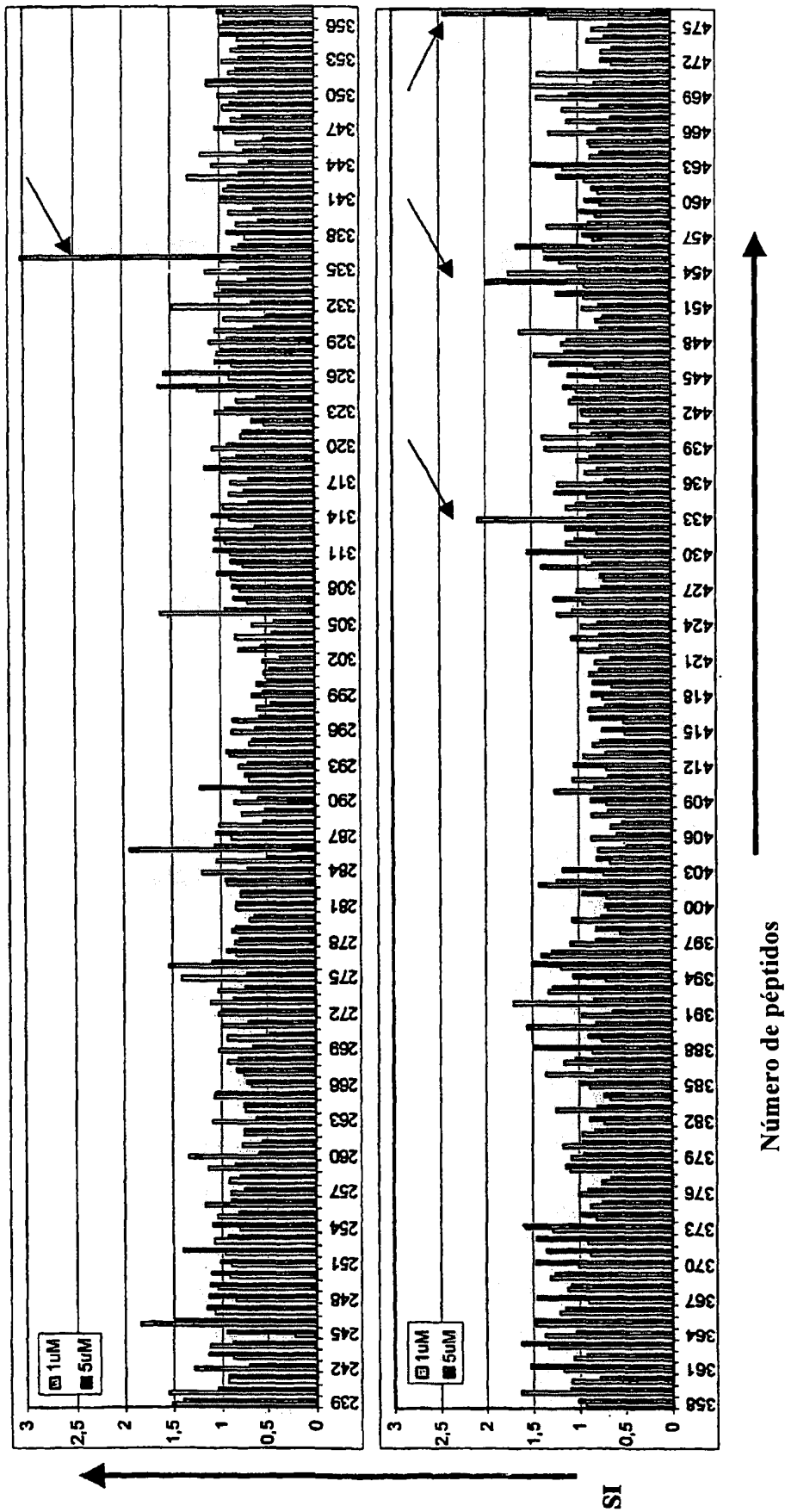


FIGURA 6

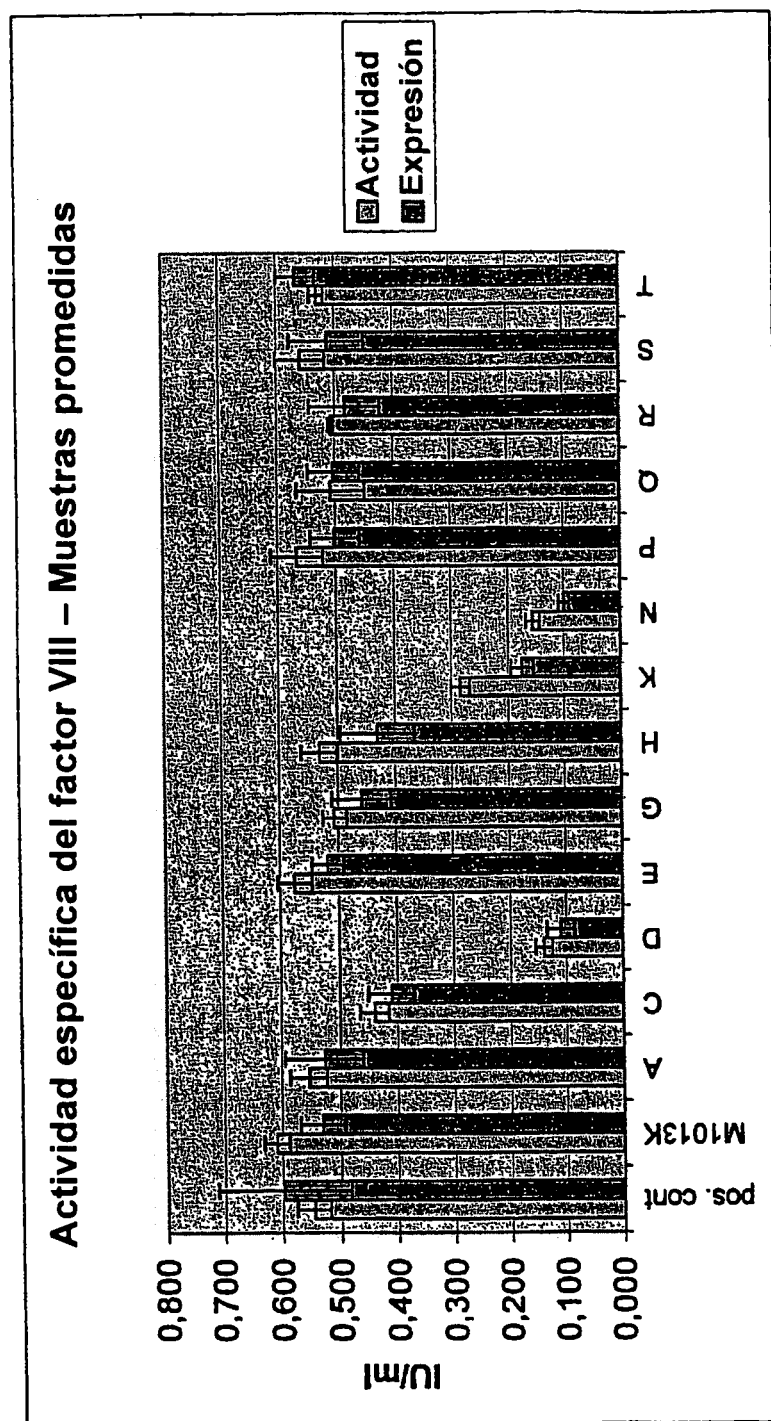


FIGURA 7

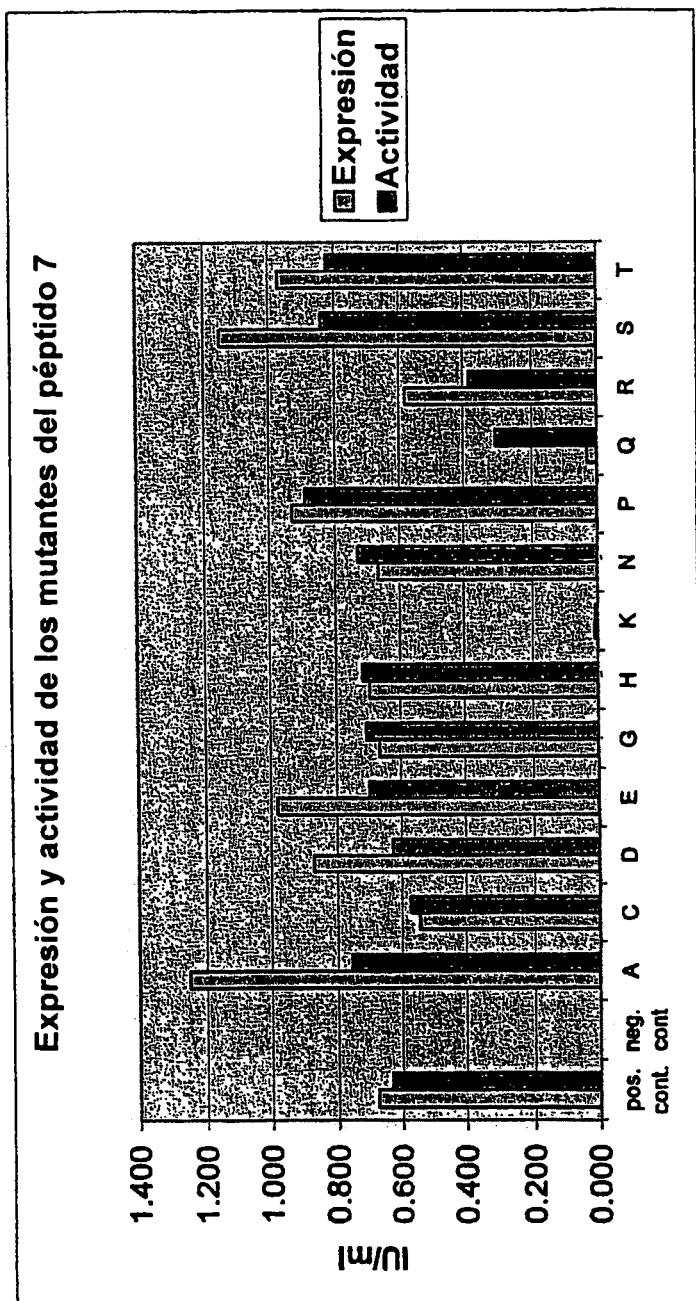
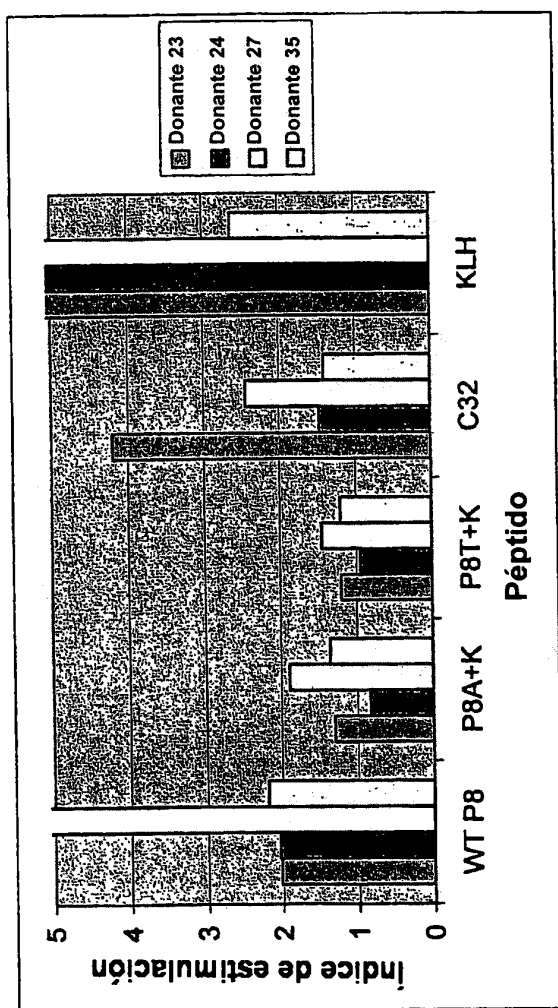


FIGURA 8



Donante nº	Alotipo de MHC
23	DRB1*04, DRB1*13, DRB3, DRB4*01
24	DRB1*03 DRB1*04, DRB3, DRB4*01
27	DRB1*03, DRB1*15, DRB3, DRB5
35	DRB1*04, DRB1*08, DRB4*01

Péptido	Secuencia	Origen
WTP8	CNIQMEDPTFKENYR	Péptido P8 inmunogénico de FVIII; residuos 1009-1023
P8K+A	CNAQKEDPTFKENYR	Péptido P8 con sustituciones I ₁₀₁₁ A + M ₁₀₁₃ K
P8K+T	CNTQKEDPTFKENYR	Péptido P8 con sustituciones I ₁₀₁₁ T + M ₁₀₁₃ K
C32	PKYVKQNTLKLAT	Péptido de control; residuos 307-319 de hemaglutinina de gripe
KLH	Proteína completa	Proteína de control; hemocianina de lapa

FIGURA 9

A) Factor VIII WT (Péptido 7)

	101	103	3011	302	401	701	801	9011	1001	11011	1201	1301	1401	15011	1602	30202	401011	50101
D																		
Y											L							
G																		
H																		
S																		
S																		
S																		
P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	L	L	L	L	L		L			L	L	L	L	L	L	L	L	L
V																		
L																		
R																		
R																		
R																		
A																		
Q																		
S																		
G	L	L	H	H	L	L	L		L	L	H	H	H			L	L	L
S																		
V																		

B) Factor VIII V_{823A}

	101	103	3011	302	401	701	801	9011	1001	11011	1201	1301	1401	15011	1602	30202	401011	50101
D																		
Y																		
G																		
H																		
S																		
S																		
S																		
P																		
H	L	L	L	L	L		L			L	L	L	L	L	L	L	L	L
A																		
L																		
R																		
R																		
R																		
A																		
Q																		
S																		
G	L	L	H	H	L	L	L		L	L	H	H	H			L	L	L
S																		
V																		

H Ligando MHC de alta afinidad; valor > 1.000.000

▒ Ligando MHC de media afinidad; valor 750.001 – 1.000.000

L Ligando MHC de baja afinidad; valor 500.000 – 750.000

FIGURA 10

1	25	50	75
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPT			
	100	125	150
IQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD			
	175	200	225
PLCLTYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLVCRÉGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA			
	250	275	300
RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTL			
	325	350	375
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRVA			
	400	425	450
KKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG			
	475	500	525
PLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSD			
	550	575	600
PRCLTRYSSFNMERDLASGLIGPLLICYPKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG			
	625	650	675
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKVMYEDTLTFPFSG			
	700	725	750
ETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONPPVLK			
	775	800	825
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL			
	850	875	900
NRAQSGSVPQFKKVVQEFQDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE			
	925	950	975
DQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGR			
	1000	1025	1050
QVTVQEFALFFTFIDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYL			
	1075	1100	1125
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSN			
	1150	1175	1200
KCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEFFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS			
	1225	1250	1275
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGC			
	1300	1325	1350
DLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT			
	1375	1400	1425
TQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPOSVWHQIAL			
	1438		
RMEVLGCEAQDLY			